

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización molecular de la resistencia al tizón  
tardío en *Solanum paucisectum* Ochoa (Solanaceae)  
mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para  
loci candidatos**

**TESIS**

para optar el título profesional de Biólogo

**AUTOR**

Lina Bernaola Alvarado

**ASESOR**

Margarita Velásquez

Marc Ghislain

**Lima – Perú**

**2008**

*“...Vive tu vida cada día como si subieras una montaña. De vez en cuando mira hacia la cima para mantener el objetivo en mente, y admira las cosas hermosas que se presentan en el camino. Sube despacio, firme, disfrutando cada momento efímero; y verás que la vista desde la cima será la recompensa perfecta tras el viaje...”*  
(Harold V. Melchert)

# Dedicatoria

A Dios, el camino y la luz que guía mi vida; por  
ser mi fortaleza diaria de ayer, hoy y siempre; y  
por darme su inmenso amor.

A mis padres David y Flor, por ser mi  
motivación de cada día; por su amor y paciencia;  
por enseñarme con el ejemplo a vivir con  
humildad y a nunca claudicar, luchando siempre  
por alcanzar mis objetivos y sueños; y  
sobretudo, por confiar en mí.

A mis hermanos David, Hugo, Liz, Sara y  
Rafael; por apoyarme y comprenderme; por  
compartir las alegrías de una familia, y por  
mantenernos unidos siempre.

A mi prima Annie, por su cariño y buenos  
deseos; y a mi sobrina Almendra, por esa  
sonrisa tierna que alegra mi vida.

A tí por llegar a mi vida y soñar conmigo en  
ella; por compartir tus horas y alentar las mías,  
y por darme tu cariño plenamente.

# Agradecimientos

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por brindarme todas las facilidades en sus instalaciones para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Marc Ghislain, por darme esta gran oportunidad profesional y la confianza que depositó en mí de realizar la tesis bajo su asesoría; por su excelente supervisión, apoyo y oportunas sugerencias que me han permitido iniciarme como investigadora, a él el más profundo de mis agradecimientos. Asimismo a Rosario Herrera, por darme la oportunidad de ingresar al CIP y su apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Marcadores I, Jorge Núñez, Guillermo Trujillo, Elena Mejía, Carlos Merino, Frank Guzmán, Isaac Rodríguez, Diego Pignataro y Pedro Palermo, por la ayuda compartida y el tiempo divertido que pasamos juntos; a Julio Solís, por el caos y el desorden del que muchas veces fuimos víctimas; disfruté mucho siendo parte de un grupo jovial de personas, la llamada gente sanmarquina, que compartíamos la “casualidad” de ser egresados de la misma Alma Mater. Igualmente y en forma especial, quiero agradecer a quienes hacían ameno y entretenido el extenuante trabajo en laboratorio, José Rodríguez y Luciano Fernández, gracias por su importante aporte técnico “yo lo hago Linita” y “no te preocupes mi Zamantha”, siempre dispuestos a ayudar y a mantener la verdadera esencia del trabajo en equipo; y por compartir conmigo su experiencia en el CIP a través de sus consejos en laboratorio e invernadero, más que compañeros de trabajo, dos grandes amigos.

A los asistentes de investigación, Genoveva Rossel, Matilde Orrillo, Ida Bartolini, Jessica Yactayo, Cristina Rivera, y Doris Carbajulca, porque de una u otra manera me apoyaron desinteresadamente y por su sincera amabilidad, aparte de sus sabios consejos basados en su trayectoria. Del mismo modo, a las secretarias del Departamento de Recursos Genéticos del CIP, Lorena Danessi, Rosita Salazar y Mónica Blanco; por la ayuda eficiente, oportuna y con la siempre amigable sonrisa.

A los técnicos de otros laboratorios, que entre todas sus tareas siempre están dispuestos a ayudar, a Luís Gutiérrez, Joel Reyes y Alberto Ramos. En especial quiero agradecer a Domingo Eusebio y Alex Barzola, con quienes tuve no sólo la oportunidad de trabajar sino también de disfrutar del buen humor que los caracteriza y de las que muchas veces fui víctima, aflorando ahora mi sentido burlesco; por esas discusiones placenteras durante sus minutos intocables del “desayuno feliz” y los “coffee breaks”, pero sobretodo por su afecto sincero que estoy segura no olvidaremos. De la misma manera a José Huamán, quién me ayudó en la fase inicial de mi trabajo, emigrando luego para un futuro mejor; gracias por tus invalorable enseñanzas, por tu infinita paciencia y desprendida amistad.

A mis amigos del CIP, a Carlos Merino, quien se sintió con la autonomía de ser mi guía profesional pero con un objetivo oculto, explotarme al máximo para terminar su trabajo; a Frank Guzmán, el que con empeño y dedicación resultó ser “Anakin” del Perú y balnearios, porque es un ser que nunca entenderé y tampoco quiero entender, pero lo acepto tal cual; a Isaac Rodríguez, por su simpatía y picardía libidinosa que lo caracteriza, y por mantener siempre la risa en el grupo; y a mis amigas Rebeca Schibli, María Lupe Román y tiempo después Rosalina Tincopa, por compartir conmigo la inolvidable experiencia de ser becarias del CIP, por esas conversaciones matutinas y vespertinas del sexo opuesto que muchas veces se convertían en rajes, desde luego no tan lejos de la verdad; a ustedes chicos, gracias por haberme demostrado siempre su cariño, por las horas dedicadas dentro y fuera del CIP, por esa agradable conexión mutua que existió desde un inicio, haciendo que las horas de trabajo fueran divertidas, pero más que nada por su amistad que no olvidaré y que perdura a pesar de que algunos ya emigraron; y en forma especial a Geoffrey González, con quien pude compartir incontables ocurrencias en instantes donde la sensatez e insensatez parecían combinarse, pero sobretodo por disfrutar el momento y aprender de ello.

A mis vecinos de otros laboratorios, la caballerosidad de mi buen amigo Percy Rojas, a Jorge Biondi, Ronald Robles, André Velásquez, Cinthya Zorrilla, Alberto Baiocchi, Fernando Serna, Milton Untiveros, Gaby Lajo y Lorena Da Ponte, que me acompañaron a lo largo de mi estadía en el CIP, con quienes he pasado también buenos momentos dentro y fuera del lab; quiero agradecerles por su amistad; por los lazos de compañerismo y lealtad que hacen de los laboratorios un grato ambiente de trabajo, ya sea prestando reactivos, intercambiando experiencias laborales y personales, así como también apoyarnos algunas veces de la incompreensión de algunos jefes, quedando todo celosamente guardado en cada uno de nosotros.

A mi asesora interna de tesis Margarita Velásquez, por su inmensa colaboración y asesoría en la presentación del trabajo. Sinceramente, su apoyo es muy valioso.

A mis amigos de la UNMSM, Ada Sumi, Rocío Gamarra, Rubén Zavaleta, William Ángeles, Giancarlo Quiroz y Kenny Dongo, gracias por su sincera amistad dentro y ahora fuera de la universidad, por exámenes, viajes y fiestas, que pienso han quedado marcados en cada uno de nosotros como parte de los mejores recuerdos de nuestra vida. Finalmente y de manera muy especial, a José Luis Buleje, mi gran amigo y compañero de aventuras, con quien siempre lograba acallar las cuitas generadas durante mi investigación e incluso desde la universidad, qué puedo decirte que no sepas... mil gracias Bulejito por estar en todo momento; por esas muestras de cariño e invalorable apoyo inclusive ahora a pesar de la distancia; pero sobre todo, por darme tu tiempo aunque a veces lo tengas que inventar.

A todos quienes hicieron que la culminación de este trabajo sea posible...

Índice

Página de Título..... i

Dedicatoria..... iii

Agradecimientos..... iv

Índice..... vi

Abreviaturas..... xi

Resumen..... xii

Abstract..... xiii

I. INTRODUCCIÓN..... 1

1.1 Objetivos..... 3

II. ANTECEDENTES..... 4

2.1 La papa..... 4

2.2 *Solanum paucissectum* Ochoa..... 7

2.2.1 Posición taxonómica..... 7

2.2.2 Características..... 7

2.3 *Phytophthora infestans* y el tizón tardío..... 9

2.4 Resistencia genética de la papa..... 12

2.4.1 Resistencia vertical (RV)..... 12

2.4.2 Resistencia horizontal (RH)..... 14

2.5 Caracteres de resistencia cuantitativa versus cualitativa..... 15

2.5.1 Genes que confieren resistencia a *P. infestans* en papa..... 16

2.5.2 QTLs que confieren resistencia a *P. infestans* en papa..... 18

2.6 Marcadores genéticos..... 20

2.6.1 Marcadores moleculares..... 20

2.6.2 Clases de marcadores moleculares..... 21

2.6.3 Marcadores *NBS*..... 25

2.7 Análogos de genes de Resistencia (RGAs) en papa..... 28

2.8 Trabajos Previos..... 29

2.9 Resistencia al tizón tardío en *S. paucissectum*..... 31

III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 33

3.1 Materiales..... 33

3.1.1 Material biológico..... 33

3.1.2 Material de laboratorio..... 33

3.1.3 Equipos de laboratorio..... 34

3.1.4 Material Químico..... 36

3.2 Métodos..... 38

3.2.1 Obtención de la progenie PCS1.....	39
3.2.2 Prueba de compatibilidad.....	39
3.2.3 Propagación <i>in vitro</i> de la progenie PCS1.....	41
3.2.4 Extracción del ADN.....	41
3.2.5 Cuantificación del ADN.....	42
3.2.6 Dilución del ADN.....	42
3.2.7 Técnica del perfil NBS.....	43
3.2.7.1 Digestión del ADN genómico y ligación del adaptador.....	44
3.2.7.2 Amplificación de los fragmentos.....	44
3.2.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	47
3.2.7.4 Obtención de la autorradiografía.....	47
3.2.8 Análisis de marcadores de genes candidatos basados en PCR.....	47
3.2.8.1 Optimización de iniciadores candidatos.....	48
3.2.8.2 Amplificación de los productos de PCR.....	49
3.2.8.3 Electroforesis de los productos amplificados.....	49
3.2.8.4 Detección del polimorfismo.....	49
3.2.8.5 Identificación de SSCP.....	49
3.2.8 Análisis de datos.....	50
3.2.8.1 Análisis de segregación.....	50
3.2.8.2 Prueba de proporciones.....	50
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Compatibilidad de la progenie PCS1 y <i>P. infestans</i> .....	53
4.2 Perfil NBS de la progenie PCS1 “762126.227 x 762124.236”.....	55
4.3 Caracterización de los iniciadores candidatos de la resistencia.....	60
4.3.1 Optimización de iniciadores candidatos.....	60
4.3.2 Análisis genotípico en la progenie PCS1 “762126.227 x 762124.236”.....	61
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
5.1 Evaluación de la infección con <i>Phytophthora infestans</i> .....	66
5.2 Evaluación de la técnica del perfil NBS.....	67
5.3 Evaluación y análisis genético de los iniciadores candidatos.....	71
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>IX. APÉNDICE.....</b>	<b>87</b>
APÉNDICE 1 Figuras.....	87
APÉNDICE 2 Preparación del medio de cultivo MSA.....	89
APÉNDICE 3 Protocolo de extracción de ADN a mediana escala.....	90

APÉNDICE 4 Perfil NBS.....	<b>91</b>
APÉNDICE 5 Análisis de marcadores de genes candidatos basados en PCR.....	<b>95</b>
APÉNDICE 6 Preparación y electroforesis del gel de secuenciamiento.....	<b>98</b>
APÉNDICE 7 Flujograma de la tinción con Nitrato de Plata.....	<b>100</b>
APÉNDICE 8 Protocolo de geles SSCP .....	<b>101</b>
APÉNDICE 9 Preparación de Soluciones.....	<b>103</b>



# Índice de Tablas

Tabla 2.1	Especies del género <i>Solanum</i> resistentes a las principales plagas y enfermedades.....	6
Tabla 2.2	Principales genes de resistencia a <i>Phytophthora infestans</i> .....	17
Tabla 3.1	Combinaciones iniciador NBS específico/enzima.....	46
Tabla 3.2	Secuencia nucleotídica de los adaptadores.....	47
Tabla 3.3	Lista de iniciadores específicos usados en la resistencia a tizón tardío en papa...	48
Tabla 4.1	Número de fenotipos observados con la prueba de hojas sueltas.....	54
Tabla 4.2	Nivel de polimorfismo de las 7 combinaciones iniciador/enzima usadas para el análisis del perfil NBS y reconocidas en la progenie PCS1.....	57
Tabla 4.3	Porcentaje de polimorfismo medio con ambas enzimas de restricción ( <i>RsaI</i> y <i>HaeIII</i> ) usadas en el perfil NBS.....	57
Tabla 4.4	Análisis de segregación, combinación iniciador NBS/enzima, modelo genético y origen del alelo marcador de los fragmentos NBS polimórficos.....	58
Tabla 4.5	Resultados y frecuencias de los productos de PCR con ambas metodologías (Agarosa al 1% y geles SSCP).....	63
Tabla 4.6	Segregación observada, modelo genético y origen del alelo marcador.....	63
Tabla 4.7	Análisis del modo de herencia en la población PCS1 usando la prueba $X^2$ para la desviación de la segregación esperada 1:1 (presencia: ausencia) de los fragmentos amplificados.....	63

# Índice de Figuras

Figura 2.1	Planta de <i>Solanum paucissectum</i> crecida en invernadero.....	8
Figura 2.2	Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i> .....	10
Figura 2.3	Síntomas de la enfermedad en papa causado por el oomiceto <i>P. infestans</i> .....	11
Figura 2.4	Interacción entre proteínas <i>Avr</i> y proteínas <i>R</i> .....	14
Figura 2.5	Resumen esquemático de QTLs conocidos para resistencia a <i>P. infestans</i> en los 12 cromosomas de la papa.....	19
Figura 2.6	Esquema representativo del ciclo de PCR.....	23
Figura 2.7	Esquema que muestra los principales pasos de la técnica NBS.....	27
Figura 3.1	Plántulas de la progenie PCS1 crecidas en invernadero.....	40
Figura 3.2	Prueba de inoculación de folíolos con aislamientos de <i>P. infestans</i> .....	40
Figura 3.3	Cuantificación de ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1%.....	42
Figura 3.4	ADN genómico digerido con dos enzimas de restricción.....	44
Figura 3.5	Representación esquemática del NBS de los genes <i>R</i> .....	45
Figura 3.6	Confirmación de los productos de la amplificación asimétrica con diferentes combinaciones iniciador NBS/enzima en agarosa al 1%.....	46
Figura 3.7	Esquema que muestra el patrón de segregación de las bandas polimórficas.....	47
Figura 4.1	Compatibilidad de los parentales con los cuatro aislamientos de <i>P. infestans</i> .....	54
Figura 4.2	Ejemplo típico de polimorfismo revelado por el perfil NBS para 12 individuos pertenecientes a la progenie PCS1.....	59
Figura 4.3	Optimización de las Ta de los iniciadores candidatos a la resistencia mediante gradientes de temperatura del iniciador <i>GP179</i> .....	60
Figura 4.4	Optimización de la amplificación de los iniciadores candidatos obtenidos con los iniciadores 57t3, GP180 y GP23.....	61
Figura 4.5	Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico <i>GP179</i> en agarosa.....	64
Figura 4.6	Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico <i>NL27</i> en agarosa.....	64
Figura 4.7	Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico <i>NL25</i> en agarosa.....	64
Figura 4.8	Productos de PCR obtenidos con los iniciadores específicos <i>BA121o1t7</i> , 57t3, <i>GP125</i> , <i>LE-HB-T7</i> en la progenie PCS1 de <i>S. paucissectum</i> .....	65
Figura 9.1	Resumen de los valores medios AUDPC de los 40 genotipos de las dos accesiones de <i>S. paucissectum</i> para el tizón tardío en dos localidades del Perú...	87
Figura 9.2	Esquema de la ligación de los fragmentos de restricción al adapter mix por medio de la enzima Ligasa T4.....	88

# Abreviaturas

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AUDPC</b>	área bajo la curva del progreso de la enfermedad (“area under disease progress curve”)
<b>CIP</b>	Centro Internacional de la Papa
<b>c.s.p</b>	cantidad suficiente para
<b>CTAB</b>	bromuro cetil-trimetil-amonio (“cetyl trimethyl ammonium bromide”)
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótido trifosfato (“deoxynucleotide-triphosphate”)
<b>EDTA</b>	ácido etilen-diamino-tetra acético (“ethylene diamine tetra-acetic acid”)
<b>HR</b>	respuesta hipersensitiva (“hypersensitive response”)
<b>LRR</b>	repeticiones ricas en leucina (“leucine rich repeat”)
<b>MAS</b>	selección asistida por marcadores (“marker-assisted selection”)
<b>NBS</b>	sitio de unión nucleotídica (“nucleotide binding site”)
<b>ng</b>	nanogramo
<b>P<sup>33</sup></b>	radioisótopo de fósforo <sup>33</sup>
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
<b>PCS1</b>	población PCS1
<b>QRL</b>	locus de resistencia cuantitativa (“quantitative resistance locus”)
<b>QTL</b>	locus de carácter cuantitativo (“quantitative trait locus”)
<b>RH</b>	resistencia horizontal
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RGAs</b>	análogos de genes <i>R</i> (“ <i>R</i> -gene analogs”)
<b>RV</b>	resistencia vertical
<b>SSCP</b>	polimorfismo en la conformación de la cadena simple (“single strand conformation polymorphism”)
<b>TA</b>	temperatura de ambiente
<b>Ta</b>	temperatura de alineamiento
<b>TBE</b>	tris-borato-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetra-metil etilen diamina
<b>TT</b>	tizón tardío
<b>λ</b>	fago Lambda
<b>μg</b>	microgramo
<b>μl</b>	microlitro
<b>μM</b>	micromolar
<b>UNMSM</b>	Universidad Nacional Mayor de San Marcos

# Resumen

El tizón tardío causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es la enfermedad más seria y devastadora en cultivos de papa alrededor del mundo. Aparte del uso de fungicidas, el uso de variedades resistentes es otro método para la protección de los cultivos contra esta enfermedad. Las especies silvestres de papa han demostrado ser una fuente continua de resistencia al tizón tardío en muchos programas de mejoramiento. Esta resistencia está controlada por genes *R* los cuales son fácilmente superados por razas nuevas de *P. infestans*, y/o por un número desconocido de genes que expresan un tipo cuantitativo de resistencia el cual podría ser más durable. Con el objetivo de caracterizar la resistencia a tizón tardío, 57 genotipos de una progenie diploide PCS1, originada del cruce entre *Solanum paucissectum* Ochoa 762126.227 (R) con *S. paucissectum* 762124.236 (S) fue analizada por medio de marcadores moleculares.

La primera parte de la tesis estuvo enfocada en la evaluación de la técnica del perfil NBS (sitio de unión nucleotídica), estrategia basada en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que eficientemente reconoce regiones cromosómicas que contienen genes *R* y análogos de genes *R* (RGAs) y al mismo tiempo produce marcadores polimórficos en estos genes. Los porcentajes de polimorfismo medio detectado al usar *RsaI* y *HaeIII* como enzimas de restricción fueron 11% y 8%, respectivamente. El número promedio de polimorfismo por combinación de iniciador-enzima fue igual a 5, con un rango que va desde 3 a 13 bandas polimórficas. Los resultados indican que el perfil NBS proporciona un medio efectivo para identificar polimorfismo en papa.

La segunda parte se encontró enfocada en la evaluación de regiones genómicas responsables para resistencia a tizón tardío. La familia PCS1 fue analizada con 15 marcadores de ADN conocidos por estar ligados a QTL (locus de carácter cuantitativo) para resistencia en el genoma de la papa. Los fragmentos de ADN específicos basados en PCR fueron probados por asociación con este carácter cuantitativo analizado. Dos marcadores significativamente ligados a QTL para resistencia a *P. infestans* fueron encontrados en los cromosomas V y XI en la progenie PCS1.

# Abstract

Late blight caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is the most serious and devastating disease of potato production worldwide. Beside fungicides, the use of resistance varieties is another strategy to protect potato production against this disease. Wild potato species have proven to be a source of resistance to late blight used by much breeding programs. This resistance is controlled by *R* genes which may be easily overcome by new races of *P. infestans*, and/or by an unknown number of genes resulting in a quantitative type of resistance which may be more durable. With the goal of characterizing resistance to late blight, 57 genotypes of a PCS1 diploid offspring originated from cross among *Solanum paucissectum* Ochoa 762126.227 (R) with *S. paucissectum* 762124.236 (S) it was analyzed by means of molecular markers.

The first part of the thesis focused on the evaluation of the NBS profiling technique, a strategy based on PCR (polymerase chain reaction) that efficiently it recognizes chromosomal regions containing *R* genes or *R* genes analogs (RGAs). At the same time it produces polymorphic markers for this gene. Mean polymorphic rates detected using *RsaI* and *HaeIII* as restriction enzymes were 11% and 8%, respectively. Mean number of polymorphisms per enzyme-primer combination was equal to 5, ranging from 3 to 13 polymorphic bands. Our results indicate that NBS profiling provides an effective means to identify polymorphism in potato.

The second part of the thesis focused on the evaluation of genomic regions responsible for resistance to late blight. PCS1 family was genotyped with 15 DNA markers known to be linked to QTL (quantitative trait locus) for resistance on potato genome. Specific DNA fragments based on PCR were tested for association with this analyzed quantitative character. Two markers significantly linked to QTL for resistance to *P. infestans* were found on chromosomes V and XI in the PCS1 progeny.

---

# Introducción

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del trigo, el maíz y el arroz (Hawkes, 1994). En el Perú, la papa se sitúa en primer lugar de producción alimentaria y ha sido fundamental durante milenios en la alimentación de los peruanos, habiendo superado al arroz y maíz en el año 2005 (MINAG, 2008). En 2006, la producción anual del cultivo fue más de 3,3 millones de toneladas métricas (FAOSTAT, 2008). Al haberse originado la papa hace unos 8000 años en los Andes de América del Sur, ha sido muy acertado que el Gobierno del Perú haya tomado la iniciativa de declarar “Año Internacional de la Papa” al presente año (AIP, 2008).

Como en muchos cultivos, la papa es susceptible a enfermedades (más de 300), y es el “tizón tardío” (TT) o “rancho”, causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, el principal problema a nivel mundial por ser muy devastador y ocasionar a veces pérdidas totales del cultivo (Fry y Goodwin, 1997). Por ello, es la enfermedad económicamente más importante que afecta a la papa (CIP, 2001). Se ha calculado que el manejo de la enfermedad cuesta \$3.5 billones anualmente sólo en países en vías de desarrollo (GILB, 2004).

Desde entonces, las estrategias de manejo para el tizón tardío en los programas de mejoramiento incluyen la aplicación de fungicidas y la obtención de variedades con resistencia a enfermedades. Sin embargo, la ocurrencia de nuevos aislamientos resistentes a algunos fungicidas modernos enfatiza la necesidad por el uso de variedades resistentes (Deahl *et al.*, 1993; Grunwald *et al.*, 2001). Además, el alto costo de aplicaciones de fungicida, junto con el conocimiento de los riesgos causados en la salud y el ambiente por la esparción de químicos, hacen también de la resistencia al hospedero una prioridad (Ghislain *et al.*, 1997).

Los programas de mejoramiento clásico para resistencia a enfermedades envuelven la identificación de fuentes de resistencia, las cuales son a menudo encontradas en especies silvestres, la introgresión de factores de resistencia en cultivares por retrocruces y la selección fenotípica de la progenie resistente (Ross, 1986). La venida de los marcadores moleculares basados en ADN, fenotípicamente neutros y disponibles en número ilimitado, provee tecnología nueva para direccionar la selección de resistencia genética. Los marcadores han sido usados para localizar y rastrear factores genéticos de resistencia que controlen la expresión cualitativa (genes *R*) y cuantitativa (QTLs) de resistencia a TT en el mapa

molecular de la papa, usando como padres genotipos resistentes de las poblaciones de mapeo correspondientes (El-Kharbotly *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Bormann *et al.*, 2004).

La identificación de numerosos genes *R* funcionales ha revelado que la mayoría codifica proteínas citoplasmáticas con dominios de sitio de unión nucleotídica (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR) y que ellos a menudo pertenecen a loci complejos comprendidos de una serie de genes relacionados (Martin *et al.*, 2003). La conservación de varios motivos estructurales dentro del dominio NBS de genes *R* en plantas ha incitado el desarrollo de estrategias basadas en la homología de secuencias estructurales con la finalidad de identificar análogos de genes *R* (RGAs) (Kanazin *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; van der Linden *et al.*, 2004) por PCR, con iniciadores degenerados diseñados de estos motivos conservados. La caracterización de los RGAs a menudo ha demostrado que se ubican en regiones ricas en genes *R* o QTLs (Geffroy *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2003; Hunger *et al.*, 2003) envueltos en la resistencia a la enfermedad, lo cual sugiere que el perfil NBS puede ser útil en la identificación de marcadores ligados a locus de resistencia. La técnica del perfil NBS combina la detección de RGAs con reducción de genoma usando iniciadores degenerados y adaptadores que anclan en motivos específicos y generan patrones de bandas que pueden ser explotados en una población segregando (van der Linden *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005; Syed *et al.*, 2006).

Por otra parte, el etiquetamiento de QTLs para resistencia a TT, basado en la genotipificación con marcadores establecidos por PCR fuertemente ligados a sitios calientes de resistencia en el mapa de la papa ha sido usado en trabajos previos por contener factores que controlan la resistencia cuantitativa o cualitativa, o ambas, a patógenos.

Uno de los principales objetivos del Centro Internacional de la Papa (CIP) ha sido desarrollar cultivares con resistencia duradera al tizón tardío utilizables en un amplio rango de ambientes. Desde 1996, debido a la preocupación causada por la aparición de nuevas variedades del hongo, se concibió la llamada “Iniciativa Global para el Tizón Tardío”, con el propósito de desarrollar cultivares de papa con resistencia duradera a todas las formas del patógeno. De esta manera, se planteó realizar estudios orientados en caracterizar la resistencia a tizón tardío en una progenie diploide PCS1, que consta de 57 individuos provenientes del cruce entre el progenitor ♀ 762126.227 (R) x progenitor ♂ 762124.236 (S) de la especie silvestre diploide *S. paucissectum* ( $2n=2x=24$ ), utilizando estrategias para la selección de marcadores mediante la evaluación de la técnica del perfil NBS y de marcadores para loci candidatos a la resistencia previamente descritos para *P. infestans*.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo General

- ✘ Caracterizar la resistencia a tizón tardío presente en el progenitor femenino *Solanum paucisectum* accesión 762126.227.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- ✘ Implementar y evaluar la eficiencia de la técnica NBS para la identificación de genes *R* y/o análogos de genes *R* (RGAs) al tizón tardío, en la progenie F1 proveniente del cruce de *S. paucisectum* 762126.227 x 762124.236 (R x S).
- ✘ Evaluación de marcadores para loci candidatos asociados a la resistencia horizontal a tizón tardío en la población de *S. paucisectum* 762126.227 x 762124.236.



---

# Antecedentes

## 2.1 La papa

La papa es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a que a lo largo de la historia ha ocupado un lugar trascendental en la producción y en la alimentación humana, siendo uno de los cultivos con mayor variabilidad genética (Ross, 1986). Investigación reciente indica que el centro específico de origen de esta planta está en los Andes del Perú y Bolivia, al norte del lago Titicaca. Con el correr del tiempo, se extendió por casi toda la región andina, obteniéndose así, cientos de variedades en las regiones altas de Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú (Hawkes, 1994). Esa época coincidió con la llegada de los españoles a Sudamérica, quienes introdujeron posteriormente el cultivo en Europa a finales del siglo XVI. Considerada primero como una curiosidad botánica y luego como un alimento muy importante para la dieta humana, la papa se propagó por todo el mundo.

Según Hawkes (1994), el género *Solanum* comprende aproximadamente 2000 especies, de las cuales 235 forman tubérculos, donde 227 especies son silvestres y ocho cultivadas. El resto del género, se encuentra formado por especies no tuberíferas tales como “la hierba mora” *Solanum nigrum*, berenjena *Solanum melongena* y algunas hierbas espinosas y arbustos (Chen, 2000). Sin embargo, la papa constituye una muy pequeña parte de este género distribuido a nivel mundial.

El genoma de todas estas especies del género *Solanum* poseen el mismo número básico de cromosomas ( $x=12$ ). Se presentan en series poliploides en un rango de diploide a pentaploide en las especies cultivadas: ( $2n=2x=24$ ) en *S. stenotomum*, *S. phureja*, *S. goniocalyx* y *S. ajanhuiri*; ( $2n=3x=36$ ) en *S. chaucha* y *S. juzepczukii*; ( $2n=4x=48$ ) en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y *andigenum*; y ( $2n=5x=60$ ) en *S. curtilobum*. Mientras que en especies silvestres, el rango se da de diploide a hexaploide, por ejemplo: ( $2n=2x=24$ ) en *S. bulbocastanum*, *S. berthaultii*, *S. verrucosum* y *S. paucisectum*; ( $2n=3x=36$ ) en *S. cardiophyllum*; ( $2n=4x=48$ ) en *S. acaule* y *S. stoloniferum*; ( $2n=5x=60$ ) en *S. edinense*; y ( $2n=6x=72$ ) en *S. demissum* (Hawkes, 1990; 1994). Hasta la actualidad, su cultivo en gran parte del mundo se ha basado en una sola especie (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*), a partir de la cual se han desarrollado la mayoría de las variedades comerciales conocidas a escala mundial. Las otras siete especies cultivadas en la zona andina son menos conocidas y corren riesgo de erosión (Horton, 1992).

Las especies de papa silvestre tienen una distribución geográfica amplia en todo Sudamérica, muestran un gran rango adaptativo entre diferentes especies a una diversidad ecológica como amplios rangos de temperatura y humedad, que van desde las zonas bajas hasta los altiplanos, entre los 2800 y 4200 msnm. Algunas especies, como *S. acaule* y *S. megistacrolobum*, pueden sobrevivir a bajas temperaturas; otras como *S. berthaultii*, *S. neocardenasii* y *S. gracilifrons* están adaptadas para el calor, sequía y condiciones semidesérticas. Debido al amplio rango de habitats en que las papas silvestres son encontradas, ellas se han adaptado a ambientes de estrés y desarrollan fuerte resistencia a un amplio rango de plagas y enfermedades (Hawkes, 1994). Sin embargo, actualmente no se ha podido comprobar una relación de la resistencia al estrés en un rango amplio de especies silvestres *Solanum* (Jansky *et al.*, 2008).

Las especies silvestres tienen un gran potencial para mejorar los cultivos en un rango de caracteres, ya que son producto de la evolución natural ocasionada por la interacción de factores abióticos y bióticos con las poblaciones de plantas genéticamente variables, lo que origina la riqueza de variación encontrada entre y dentro de las especies. Asimismo, estas especies contienen genes codificando numerosos caracteres no encontrados en cultivares y representan una fuente especialmente rica de genes de resistencia a la enfermedad (Jansky, 2000). Como en todos los cultivos, la papa es susceptible a patógenos y enfermedades, donde el “tizón tardío” (TT) causa las mayores pérdidas a nivel mundial, seguida también, por otras enfermedades no menos importantes como la “marchitez bacteriana” (MB), el “virus X e Y de la papa” (PVX, PVY), el “virus del enrollamiento de la hoja” (PLRV) y el “nemátodo cístico de la papa”; por ello, fue probablemente el primer cultivo, en el cual, el mejoramiento para resistencia a las plagas y enfermedades fue realizado. Ciertas especies son particularmente útiles en este aspecto y algunas como, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. berthaultii*, *S. stoloniferum* y *S. acaule* son bien conocidas en la literatura (**Tabla 2.1**).

Según Spooner y Hijmans (2001), la papa (*Solanum* L. Sección *Petota* Dumort) contiene aproximadamente 190 especies silvestres relacionadas que representan una diversa fuente genética. Spooner y Castillo (1997) establecieron un esqueleto filogenético molecular que distinguió 4 clados en papa, en contraste a la anterior hipótesis que lo dividió en series (Hawkes, 1990; Spooner y van der Berg, 1992). Entre las más conocidas, *S. demissum* es miembro del clado 4; *S. bulbocastanum* está en el clado 2; y *S. pinnatisectum* está en el clado 1. Recientemente se ha reportado el primer mapa genético y loci de resistencia al tizón tardío e integra especies del clado 3 como *S. paucissectum* (Villamon *et al.*, 2005).

**Tabla 2.1.** Especies del género *Solanum* resistentes a las principales plagas y enfermedades. Sólo las especies más importantes han sido incluidas. (Tomado de Hawkes, 1990)

**Resistencia a Oomiceto**

*Phytophthora infestans* (tizón tardío)  
*S. demissum*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum*, *S. berthaultii*, *S. chacoense*.

**Resistencia a Bacteria**

*Pseudomonas solanacearum* (marchitez bacteriana)  
*S. chacoense*, *S. sparsipilum*, *S. stenotomum*.

**Resistencia a Virus**

Virus X de la papa  
*S. acaule*, *S. chacoense*, *S. curtilobum*.  
Virus Y de la papa  
*S. chacoense*, *S. stoloniferum*, *S. demissum*.  
Virus del enrollamiento de la hoja de papa  
*S. demissum*, *S. acaule*.

**Resistencia a Nemátodo**

*Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida* (nemátodo cístico de la papa)  
*S. acaule*, *S. bulbocastanum*.

Para el año 2007, la producción mundial del cultivo de papa ha mostrado un incremento significativo en los últimos 10 años, con un promedio anual de 320 millones de Toneladas Métricas (TM) (FAOSTAT, 2008), encontrándose entre los diez alimentos mas importantes en términos de volumen de producción anual. En el Perú, es un alimento de mucha importancia y mantiene un promedio de producción superior a los 3 millones de TM anuales en los 5 últimos años (FAOSTAT, 2008). A pesar de esto su producción se ve afectada por la presencia de diversos patógenos, siendo la enfermedad del tizón tardío, la más importante, por causar las mayores pérdidas en el ámbito mundial (Horton, 1992). La papa cuenta con una fuente importante de vitaminas, carbohidratos, minerales y un alto contenido de aminoácidos esenciales como la lisina.

## 2.2 *Solanum paucisectum* Ochoa

### 2.2.1 Posición taxonómica

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Asteridae

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** *Solanum*

**Sección:** *Petota* Dumortier

**Especie:** *Solanum paucisectum* Ochoa

Fuente: Ochoa (1999); Hawkes (1990); Spooner y Hijmans (2001).

### 2.2.2 características

*Solanum paucisectum* Ochoa es una especie silvestre diploide ( $2n=2x=24$ ). Tiene una distribución muy restringida y es endémica del departamento de Piura, provincia de Huancabamba. Se encuentra principalmente entre Cashapampa, Ciénago Largo y el Cuello del Indio, subiendo de Juzgara hacia el paso Cuello del Indio, entre ciénagas y suelos muy húmedos, al norte del Perú, a 3200 msnm (Ochoa, 1999). El interés de esta especie se basó por mostrar algunas características agronómicas deseables que la hacen candidata en los programas de mejoramiento genético, pero en especial por expresar resistencia al tizón tardío en su hábitat natural, además de la cruzabilidad que presenta con muchas especies sudamericanas, la auto-compatibilidad y la fertilidad, así como soportar altas humedades, prediciéndola como una potencial y valiosa fuente de resistencia. En 1982, esta especie fue colectada por Carlos Ochoa y el Ing. Alberto Salas para ser mantenidas desde entonces en el Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa CIP (**Figura 2.1**).



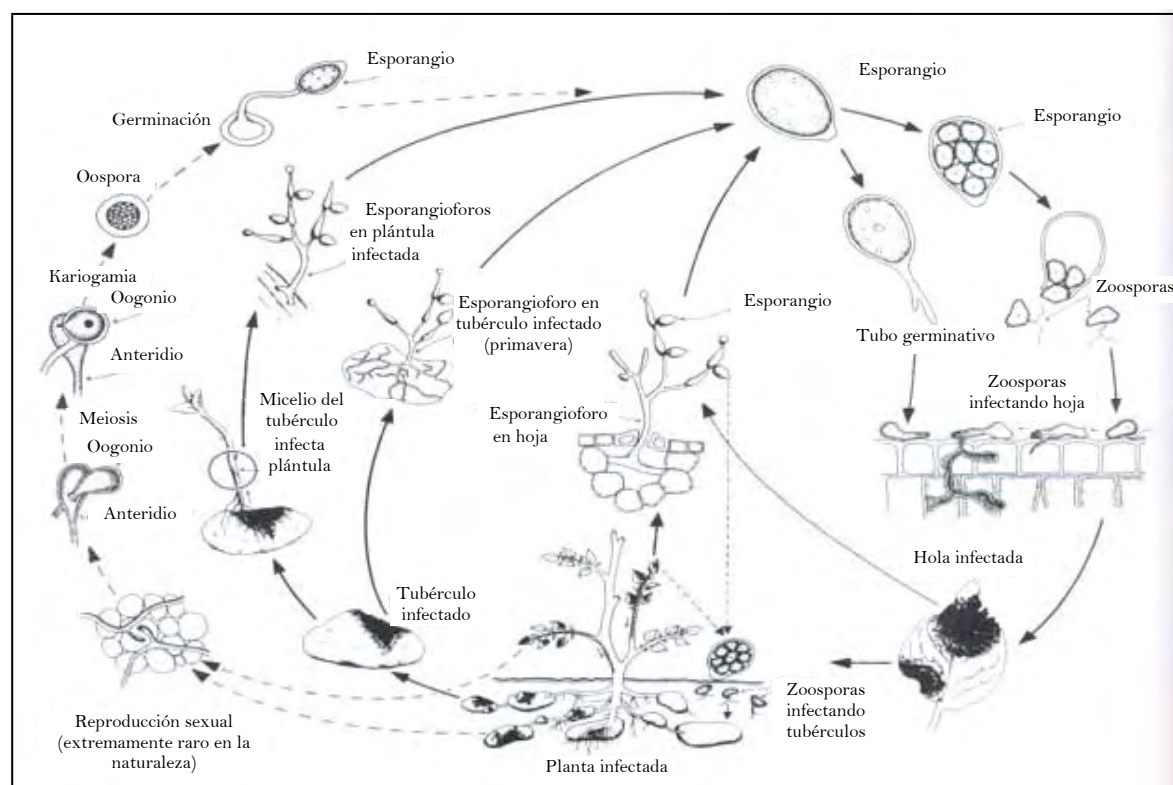
**Figura 2.1.** Planta de *Solanum paucisectum* crecida en invernadero.

### 2.3 *Phytophthora infestans* y el tizón tardío

El tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Kamoun y Smart, 2005), es la enfermedad más devastadora de la papa a nivel mundial. Esta enfermedad es conocida también como rancha, lancha, gota o candelilla en América Latina. El episodio más dramático en la historia de los efectos destructivos de esta enfermedad ocurrió en Irlanda en 1845, cuando un millón de personas perdieron la vida a causa de la hambruna originada por la destrucción de los cultivos de papa, por ser la principal fuente alimenticia de la población, y un millón y medio fueron obligados a migrar hacia Europa y Norte América (Fry y Mizubuti, 1998).

Etimológicamente *Phytophthora* proviene de la unión de los vocablos griegos phyto=planta y phthora=destructor. La clasificación taxonómica del género *Phytophthora* con relación a otros géneros de hongos es muy discutida. Este patógeno, miembro de la clase Oomyceta, pertenece al reino Cromista y está relacionado filogenéticamente con las diatomeas y algas pardas. Este oomiceto se caracteriza por poseer micelio cenofítico, pared celular carente de quitina compuesta principalmente por  $\beta$ -glucanos y celulosa, y no tienen capacidad de sintetizar los esteroides; características que hacen suponer que los oomicetos han co-evolucionado a partir de líneas diferentes de los hongos superiores como Ascomycetos y Basidiomycetos (Pérez y Forbes, 2008).

*P. infestans* presenta reproducción asexual por zoosporas biflageladas y la reproducción sexual se realiza entre gametangios morfológicamente diferentes, es heterotálico con dos tipos de apareamiento, A1 y A2 (Erwin y Ribeiro, 1996). El ciclo de infección de *P. infestans* en la reproducción asexual comienza en agua libre y a bajas temperaturas, donde los esporangios germinan indirectamente produciendo zoosporas biflageladas (3 a 8 por esporangio), y cuando son liberadas, estas se enquistan sobre superficies del tejido de la planta (**Figura 2.2**). Luego, en presencia de humedad (de casi 100%), pueden desarrollar un tubo germinativo y penetrar a la hoja por los estomas. La germinación directa de los esporangios es también posible a temperaturas más altas de 16°C, formando un tubo germinativo que penetra a través de la cutícula, y la haustoria (estructura alimenticia biotrófica del patógeno) es formada en la célula invadida de la planta. Este patógeno crece a altas humedades y a temperaturas entre 15-25°C cuando entra en contacto con cultivos de papa, tomate y especies cercanamente relacionadas de la familia Solanaceae.



**Figura 2.2.** Ciclo de vida de *Phytophthora infestans* (Fuente: Adaptado de Agrios, 1997).

Este oomiceto es considerado como un organismo hemibiotrófico, ya que en el primer estadio de infección requiere contacto biotrófico con la planta hospedera y logra en la fase posterior desarrollar sus estructuras en el tejido de la planta infectada como un patógeno necrotrófico (Ingram y Williams, 1991; Judelson *et al.*, 1997). *P. infestans* ataca a la papa, infectando la planta en los diferentes órganos, hojas, tallos, raíces, tubérculos, flores y frutos; son las hojas y el tallo los que presentan las mayores lesiones necróticas, donde luego las áreas infectadas serán cubiertas con micelio de *P. infestans* (**Figura 2.3**). La fase de infección foliar provoca la disminución en la capacidad fotosintética debido a la destrucción de los tejidos, resultando en una reducción del rendimiento en la producción del tubérculo; en la fase de infección del tubérculo, se genera pudriciones de éste estropeando la producción irreversiblemente.

Hay suficiente evidencia genética para proponer que *P. infestans* es originario de la sierra central de México, debido a que se han encontrado los dos grupos de apareamiento, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, que al estar en un mismo ambiente se pueden reproducir sexualmente, otorgando al patógeno mayor variabilidad genética, ya que resulta en la aparición de nuevas razas, las cuales son más virulentas y resistentes a los fungicidas de uso común (Fry y Mizubuti, 1998).

Las recientes migraciones de *P. infestans* son más agresivas, lo cual empieza a ser menos predecible y menos controlable la enfermedad en áreas de producción de papa, razón por la cual es considerada una de las más importantes enfermedades a nivel mundial, con un costo de 2.75 billones de dólares anuales (CIP, 2001), el cual se eleva considerablemente si se repasa el presupuesto destinado al uso de funguicidas para controlar su proliferación; si a estos costos se le añade el daño ambiental que implica el uso de estos agroquímicos, el precio de la lucha contra el tizón tardío resulta muy alto.



**Figura 2.3.** Síntomas de la enfermedad en papa causado por el oomiceto *P. infestans*. Todas las partes de la planta de papa son blancos perfectos para la infección. Las hojas infectadas son mostradas al lado izquierdo, el tubérculo al centro, y las plantas enteras en el campo al lado derecho. (Fuente: Garelik G., 2002).



## 2.4 Resistencia genética de la papa

Las enfermedades fúngicas en plantas afectan notablemente su producción, causando hasta 15% de pérdidas de cosechas mundiales (Samborski, 1985). Los pesticidas proveen una protección efectiva contra enfermedades de plantas, pero su aplicación puede estar ligada a adversos efectos ambientales. Por lo tanto, muchos esfuerzos han sido invertidos hacia la lucidez de los mecanismos de resistencia innata en plantas como el modo más eficiente para controlar las enfermedades mientras esta disponible la suficiente variabilidad genética (McDowell y Woffenden, 2003). Así, la resistencia es definida como la habilidad de una planta que impide o retrasa el desarrollo de un patógeno o algún otro factor que cause daño, dependiendo en parte de la presencia de barreras preformadas y la respuesta activa que induce el patógeno (Umareus y Umareus, 1994). Por ello, la resistencia genética es la herramienta más importante que puede encontrar el hombre para la protección de los cultivos, debido a que se pueden obtener variedades mejoradas que presenten resistencia más duradera (Colon *et al.*, 1995).

Desde un sentido evolutivo, toda resistencia es transitoria. Hay una constante “carrera armamentista” entre los mecanismos de ataque del patógeno y los mecanismos de defensa del hospedero, lo cual resulta en co-evolución (Parlevliet, 1997). Generalmente se distinguen 2 tipos de resistencia a *P. infestans* (Ross, 1986; Ghislain *et al.*, 1997): resistencia vertical y resistencia horizontal.

### 2.4.1 Resistencia vertical (RV)

Llamada también resistencia hipersensitiva, específica, monogénica o cualitativa, está controlada por genes mayores de resistencia (genes *R*) de herencia mendeliana simple que se expresan en condición dominante y por estas razones son de fácil manejo en los programas de mejoramiento. Un claro ejemplo en la identificación de fuentes de genes de resistencia (*R*) vertical al tizón tardío, lo constituye la especie silvestre *S. demissum*, en la que se han identificado 11 genes *R* (*R*1 a *R*11), los cuales han sido incorporados por los mejoradores a diferentes variedades de papas cultivadas. Sin embargo, el uso de este tipo de resistencia no es muy duradera debido a que *P. infestans* desarrolla diferentes razas con mayor virulencia, las cuales pueden superar la resistencia de la planta, por ello esta resistencia tiene la desventaja de no ser durable ya que actúa sólo contra razas específicas del hongo y es vencida con relativa facilidad por mutación o recombinación sexual del patógeno (Agrios, 1997).

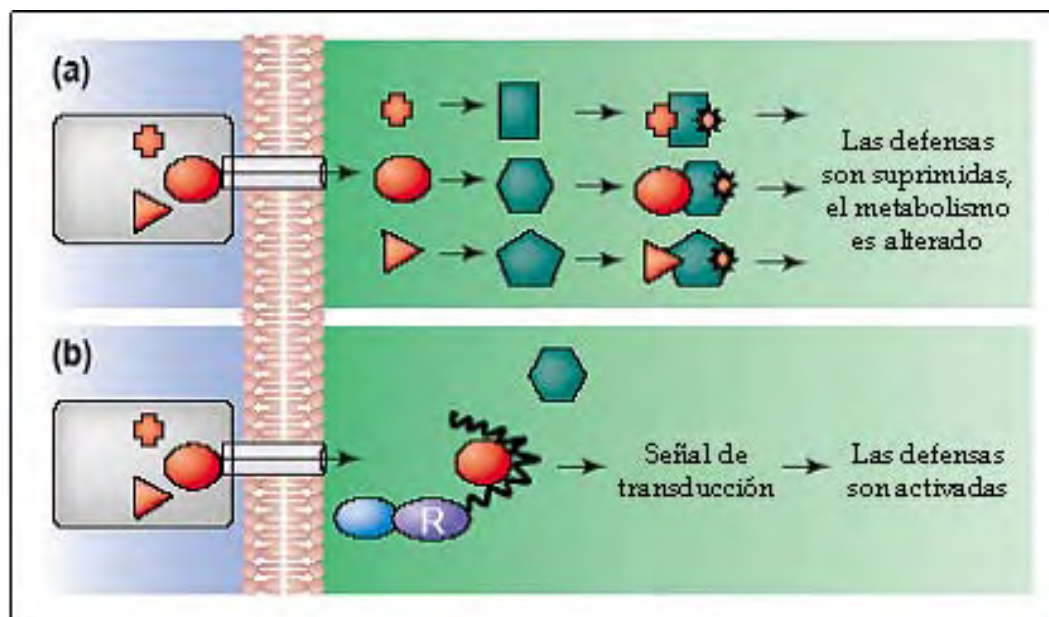
Flor en 1971, citado por Keen (1990), propuso un modelo genético basado en la interacción gen por gen entre planta - patógeno, que proyecta la relación específica entre un gen de resistencia *R* de la planta y un gen avirulento *Avr* del patógeno, cuando estos genes son expresados se da la inducción de una respuesta fuerte de resistencia, conocida como respuesta hipersensitiva. Los genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno resultan muy útiles para un reconocimiento específico por ciertas especies de plantas, aunque su función en los patógenos es desconocida y no comprendida.

Aquí se originan dos tipos de interacción planta – patógeno:

- **Interacción incompatible:** ocurre cuando la interacción entre la planta y el patógeno resulta en una respuesta de inmunidad (respuesta hipersensitiva). Consiste en una rápida y específica reacción de necrosis en la región infectada, cuya finalidad es aislar al patógeno eliminando el sustrato, con lo cual hay una ausencia de parasitismo y presencia de lesiones necróticas foliares localizadas (Robinson, 1996).
- **Interacción compatible:** se da cuando la planta es susceptible al ataque del patógeno, es decir, es la capacidad de éste para lograr infectar a su hospedero en virtud a que sus factores de virulencia (alelos *avr*) se encuentran en condición recesiva, logrando así superar a los genes *R* de la planta (Keen, 1990).

Según el modelo de Receptor - Elicitor, los genes de resistencia de las plantas codifican receptores proteicos que tienen dos funciones: una el reconocimiento de moléculas, llamadas elicitores o elicinas, codificados por los genes avirulentos del patógeno y la segunda el desencadenamiento de la respuesta Hipersensitiva (Keen, 1990) (**Figura 2.4**).

Ingram y Williams (1991) propusieron que deben de existir  $2^{11} = 2048$  razas de *P. infestans*, considerando 2 alelos por cada locus de un gen *R*, con lo que la aparición de razas virulentas se hace más probable, peligrando así la resistencia que pueden presentar los cultivos de *Solanum* spp. Recientemente, otra especie silvestre, *S. bulbocastanum*, ha adquirido importancia, ya que se ha ubicado un gen *R* proveniente del cromosoma VIII, que confiere resistencia ante el ataque de distintos tipos de razas de *P. infestans* (Naess *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003).



**Figura 2.4.** Interacción entre proteínas *Avr* y proteínas *R*, las figuras rojas muestran las proteínas de virulencia del patógeno (Adaptado de McDowell y Woffenden, 2003): a) la planta no está expresando el producto del gen *R* resultando en una interacción compatible; b) el producto del gen *R* de la planta interactúa directamente con el producto del gen de avirulencia del patógeno, resultando en una interacción incompatible.

#### 2.4.2 Resistencia horizontal (RH)

Llamada también resistencia de campo, inespecífica, poligénica o cuantitativa, está probablemente gobernada por varios genes con pequeñas y moderadas contribuciones a la resistencia horizontal (Black, 1970). Aparentemente, este tipo de resistencia no implica una interacción gen por gen y por eso es definida como la resistencia uniformemente distribuida contra todas las razas del patógeno. Estos genes en conjunto ofrecen una resistencia que es estable y no dirigida a detener el desarrollo de nuevas razas sino a reducir el daño que las razas existentes puedan ocasionar, retardando así el desarrollo de la enfermedad en la planta, permitiendo realizar un manejo oportuno del patógeno para evitar su propagación (Robinson, 1996). En general, la resistencia horizontal en una progenie segregante es independiente del genotipo del patógeno y tiene una distribución continua, presentando individuos susceptibles, medianamente resistentes y un grupo de individuos con alta resistencia.

La RH puede ser expresada de muchas maneras, como la producción de exudados tóxicos en la superficie de las hojas, confinamiento de las estructuras fúngicas a las paredes celulares, escasa colonización del mesófilo, colapso lento de los pecíolos y reducción del rango

reproductivo del patógeno, es decir se presentan barreras fisiológicas o químicas en los tejidos del huésped que dilatan el rango, la frecuencia de penetración y la reproducción del oomiceto (Wastie, 1991; Colon *et al.*, 1995). El modo de acción de la RH es interrumpir o retrasar uno o más estadios del ciclo biológico del patógeno.

## 2.5 Caracteres de resistencia cuantitativa versus cualitativa

En el ámbito genético, dos clases de resistencia existen en la naturaleza: cualitativa (RV) y cuantitativa (RH). Como ya se mencionó (ver sección 2.4), la RV esta controlada por un gen *R* simple; y está caracterizada por dos clases fenotípicas discretas, resistencia y susceptibilidad, siguiendo un patrón de herencia mendeliana. En cambio, la RH está gobernada por varios genes desconocidos responsables por el fenotipo de la resistencia. Ambos tipos de resistencia han sido usados en los programas de mejoramiento de papa contra el tizón tardío. La variación genética en la naturaleza muestra a menudo los rasgos de una distribución continua cuantitativa del fenotipo observado lo que cae dentro de muchas clases fenotípicas, por lo que la RH o de campo suele ser más durable que la RV, ya que no puede ser superada fácilmente por nuevas razas de *P. infestans*.

Varias estrategias han sido descritas para lograr resistencia durable en plantas (McDowell y Woffenden, 2003). Una manera para crear resistencia amplia en plantas es coordinar la expresión de un gene *R* con el correspondiente transgen *Avr* del patógeno donde el transgen es controlado por un promotor de planta patógeno inducible. Armstrong *et al.* (2005), recientemente, han clonado y caracterizado el primer gen *Avr* de *P. infestans* (*Avr3a*), lo que muestra que su producto es reconocido en una manera *R3a* dependiente en el citoplasma de la planta. El aislamiento de *R3a* y *Avr3a* representa una oportunidad para investigación detallada de los eventos de reconocimiento más tempranos de la interacción entre *R-Avr* lo que desencadenará una respuesta de resistencia en la planta.

Hoy en día, gracias a los análisis de marcadores moleculares y marcadores moleculares ligados a valores fenotípicos, es posible detectar QTLs (Asíns, 2002). Un locus de carácter cuantitativo (QTL) es un locus en el genoma que tiene uno o más factores genéticos, genes, los cuales contribuyen al fenotipo cuantitativo observado en la población bajo estudio. La variación genética debajo de los fenotipos cuantitativos es un resultado de múltiples QTLs que segregan, cada uno explica una porción del total de variación cuantitativa, donde su expresión es manifestada también por el impacto de los factores ambientales (Gebhardt y Valkonen, 2001; Paran y Zamir, 2003; Koornneef *et al.*, 2004).

La variación alélica de un gen que da lugar al efecto cuantitativo tiene una gran variabilidad causal en la función de la proteína alterada, pérdida de la función, cambio en el nivel de expresión, sustitución del aminoácido o incluso genes anulados. La variación alélica puede no sólo ocurrir en las regiones codificantes sino también en las regiones no codificantes causando alteraciones en la estabilidad del gen (Paran y Zamir, 2003; Koornneef *et al.*, 2004). Un gen único con una contribución mayor a la resistencia es aun detectable por marcadores relativamente distantes, mientras que un gen o grupo de genes con efectos pequeños es detectable sólo por marcadores más cercanamente ligados. La integración de QTL para resistencia a *P. infestans*, nemátodo cístico y *Erwinia carotovora* en el mapa funcional de la papa, revela varios ejemplos de ligamiento entre QTL y genes *R*. Esto fue primero observado cuando marcadores RFLPs GP21 y GP179 flanqueando al gen *R1*, también detectaron los efectos más largos de resistencia cuantitativa a *P. infestans* en el cromosoma V de la papa (Leonards-Schippers *et al.*, 1994).

### 2.5.1 Genes que confieren resistencia a *P. infestans* en papa

En los pasados 15 años, más de 40 genes *R* que confieren resistencia a bacterias, oomicetos, nemátodos, virus e insectos han sido mapeados y clonados (Martin *et al.*, 2003). La gran mayoría de los genes caracterizados pertenecen a la súper familia NBS-LRR. Los genes *R* codifican receptores putativos en la planta que responden a los productos de los genes de avirulencia expresados (*Avr*) por el patógeno durante la infección lo que resulta en la activación de la respuesta de defensa (respuesta hipersensitiva), y ocasiona la resistencia en la planta.

De los 11 genes *R* conocidos confiriendo resistencia a *P. infestans*, sólo cinco han sido localizados en el mapa genético de la papa. El primer gen *R1* fue identificado en el cromosoma V (Leonards-Schippers *et al.*, 1992); el gen *R2* ha sido mapeado en el cromosoma IV (Li *et al.*, 1998); y los genes *R3a*, *R3b* (Huang *et al.*, 2004), *R6* y *R7* en el cromosoma XI (El-Kharbotly *et al.*, 1996). Todos estos genes *R* son originados de la especie de papa silvestre *S. demissum*, donde sólo los genes *R1* (Ballvora *et al.*, 2002) y *R3a* (Huang *et al.*, 2005) han sido clonados y secuenciados. Otros genes de resistencia a tizón tardío han sido también mapeados provenientes de nuevas especies de *Solanum* silvestre, como *Rber* de *S. berthaultii* en el cromosoma X (Ewing *et al.*, 2000), *Rblb* (*RB*) de *S. bulbocastanum* en el cromosoma VIII (Naess *et al.*, 2000) y el gen *Rpi1* de *S. pinnatisectum* en el cromosoma VII (Kuhl *et al.*, 2001). Estos genes confieren resistencia a razas existentes de *P. infestans* que llevan múltiples factores de virulencia; donde para citar, tres genes *R* de *S. bulbocastanum* han sido clonados, los genes

alélicos *RB* (Song *et al.*, 2003) y *Rpi-blb1* (van der Vossen *et al.*, 2003) en el cromosoma VIII, el gen *Rpi-blb2* en el cromosoma VI (van der Vossen *et al.*, 2005) y el gen *Rpi-blb3* en el cromosoma IV (Park *et al.*, 2005a) (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.2.** Principales genes de resistencia a *Phytophthora infestans*

Gen	Cromosoma	Marcador anclado cerca al gen <i>R</i>	Fuente de resistencia	Referencia
<i>R2</i>	IV	–	<i>S. demissum</i>	Li <i>et al.</i> , (1998)
<i>Rpi-blb3</i>		CT229, TG506	<i>S. Bulbo-castanum</i>	Park <i>et al.</i> , (2005a)
<i>R1</i>	V	GP21, GP179	<i>S. demissum</i>	Leonards-Schippers <i>et al.</i> , (1992)
<i>Rpi-blb2</i>	VI	CT229, TG505	<i>S. Bulbo-castanum</i>	van der Vossen <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rpi1</i>	VII	TG20A, CP56	<i>S. Pinnati-sectum</i>	Kuhl <i>et al.</i> , (2001)
<i>RB</i>	VIII	TG513, CT64	<i>S. Bulbo-castanum</i>	Naess <i>et al.</i> , (2000)
<i>Rpi-blb1</i>		CP53	<i>S. Bulbo-castanum</i>	van der Vossen <i>et al.</i> , (2003)
<i>Rber</i>	X	TG63	<i>S. berthaultii</i>	Ewing <i>et al.</i> , (2000)
<i>R3</i>	XI	TG105 (a)	<i>S. demissum</i>	El-Kharbotly <i>et al.</i> , (1994)
<i>R3a, R3b</i>		GP185, GP250	<i>S. demissum</i>	Huang <i>et al.</i> , (2005)
<i>R6</i>		GP185, GP250	<i>S. demissum</i>	El-Kharbotly <i>et al.</i> , (1996)
<i>R7</i>		GP185, GP250	<i>S. demissum</i>	El-Kharbotly <i>et al.</i> , (1996)

En papa, muchos genes que otorgan resistencia a diferentes razas del patógeno o incluso a diferentes patógenos tienden a agruparse en el genoma en una misma región cromosómica, lo que probablemente indicaría que estos agrupamientos evolucionaron a partir de ancestros comunes por duplicación génica en tandem y recombinación, seguidas de una posterior diversificación estructural y funcional (Gebhardt y Valkonen, 2001). Es así, que un

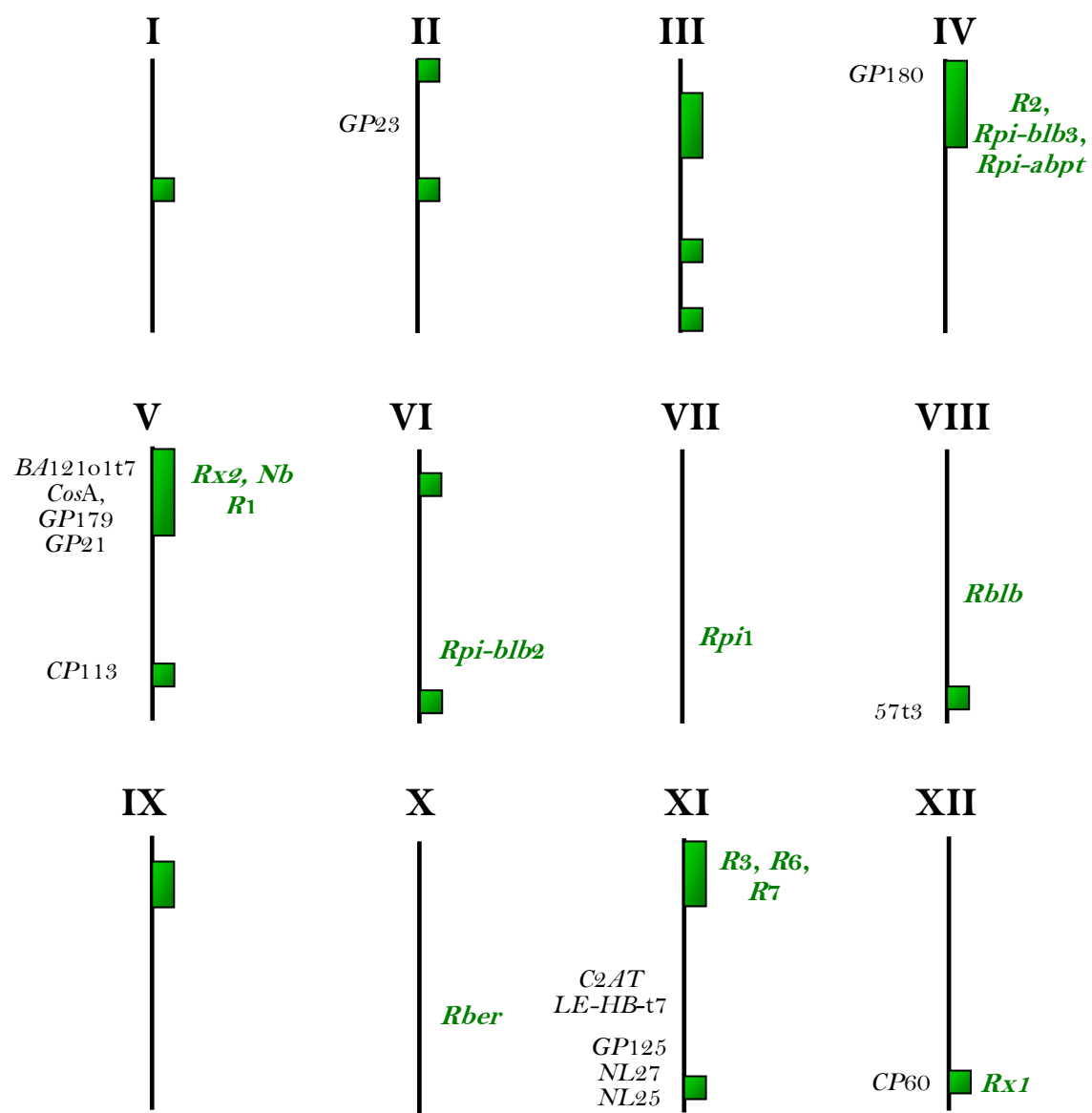
grupo mayor o “sitio caliente” para resistencia fue encontrado en el cromosoma V, donde al menos tres genes para resistencia al oomiceto y virus han sido localizados; el gen *R1* que confiere resistencia a *P. infestans*, y los genes *Rx2*, *Nb* ambos confiriendo resistencia al virus X de la papa han sido clonados. Un segundo grupo mayor de genes de resistencia es encontrado en el cromosoma IV, donde tres genes han sido localizados confiriendo resistencia al oomiceto (*R2*, *Rbi-blb3*, *Rpi-abpt*). Del mismo modo, los genes *R3a*, *R3b*, *R6* y *R7* forman otro grupo de genes que confieren resistencia a diferentes razas de *P. infestans* en el segmento distal del cromosoma XI.

### 2.5.2 QTLs que confieren resistencia a *P. infestans* en papa

Factores que controlan la resistencia cuantitativa (QTLs) a *P. infestans* han sido encontrados en casi todos los cromosomas de la papa a través de marcadores basados en ADN (RFLP, AFLP, SSR, SSCP), y confirman la verdadera naturaleza poligénica de este carácter. Cerca de 20 QTLs para resistencia al oomiceto han sido identificados en poblaciones de papa diploide y tetraploide (**Figura 2.5**).

El más fuerte y reproducible QTL está en el cromosoma V, donde además de los tres genes mayores de resistencia (*R1*, *Rx2* y *Nb*), localizados en esta región, dos QTLs que confieren resistencia al nemátodo cístico de la papa *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* han sido localizados, y reafirma la hipótesis acerca de la existencia de un “sitio caliente” en esta región. Este efecto de QTL fue encontrado en casi todos los experimentos de mapeo en trabajos anteriores (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Bormann *et al.*, 2004).

Otros cuatro QTLs reproducibles fueron detectados en el cromosoma III (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Visker *et al.*, 2003a), en el cromosoma IV (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Sandbrink *et al.*, 2000), en el cromosoma XI (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Bormann *et al.*, 2004) y en el cromosoma XII (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ghislain *et al.*, 2001; Bormann *et al.*, 2004).



**Figura 2.5.** Resumen esquemático de QTLs conocidos para resistencia a *P. infestans* en los 12 cromosomas de la papa (barras verdes). Los genes mayores de resistencia (*R*) para *P. infestans* y otros patógenos son mostrados a la derecha (verde). Los marcadores probados en el presente estudio son indicados al lado izquierdo del cromosoma (negro).



Fueron identificados varios QTLs menores con bajo impacto en la variancia fenotípica y poca reproducibilidad, en diferentes cromosomas por diversos investigadores, como los reportados en el cromosoma I (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999), en el cromosoma II (Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999), en el cromosoma VI (Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999), en el cromosoma VII (Ghislain *et al.*, 2001), en el cromosoma VIII (Meyers *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Bormann *et al.*, 2004) y en el cromosoma IX (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Bormann *et al.*, 2004).

## 2.6 Marcadores genéticos

Un marcador genético es un carácter de distintos estados identificables y determinados por uno o varios segmentos de ADN, cuya herencia se puede rastrear entre los individuos de la población según las leyes mendelianas de un factor simple (NHGRI, 2008). Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, asociada a caracteres como colores, formas o dimensiones expresadas en los individuos, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Si embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia epistática o ambiental limitaba su uso (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La revolución en este campo se inicio con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de la técnica se extendió prácticamente a todas las especies de plantas (Moss, 1982). Con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel del ADN, los llamados marcadores moleculares, que en general, pueden acelerar los programas de mejoramiento genético.

### 2.6.1 Marcadores moleculares

Un marcador molecular es cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia ser monitoreado. Entre las principales ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos están las siguientes (Ferreira y Grattapaglia, 1998):

- ✓ En general, no presentan influencia fenotípica (neutros), la interacción entre el medio ambiente y las regiones de ADN, es nula, ya que éstas no son codificantes. Se puede hacer el estudio del fenotipo sin interferencia alguna del locus marcador.
- ✓ El nivel de polimorfismo de los marcadores moleculares es alto para cada locus estudiado, determinado por las características reproductivas del organismo, el flujo génico, selección, así como a los eventos moleculares que presenta la herencia del marcador, recombinación genética, y mutaciones puntuales; además los métodos para detectar el polimorfismo en los marcadores moleculares son más sensibles y objetivos que los empleados para los marcadores morfológicos.
- ✓ La abundancia esta referida a la ocurrencia de variaciones alélicas en los marcadores moleculares, a lo largo de todo el genoma de una especie. Teóricamente es posible cubrir todo el genoma y detectar todos los poligenes de una especie.
- ✓ En su mayoría, son codominantes y contienen mayor información genética por locus que los marcadores morfológicos. En cualquier generación segregante se pueden detectar los diferentes alelos de un marcador molecular.
- ✓ Hay ausencia de epistasis y pleiotropía, y los marcadores moleculares al no mostrar estos efectos de interacción génica, hacen posible su empleo en número ilimitado de marcadores segregantes sobre una población en estudio, facilitando la construcción de mapas genéticos.

### **2.6.2 Clases de Marcadores moleculares**

#### **✱ Marcadores de ADN basados en hibridización**

Incluye principalmente a la técnica RFLPs, del inglés “Restriction Fragment Length Polymorphism”. Estos marcadores provienen de la digestión del ADN con enzimas de restricción que reconocen secuencias nucleotídicas específicas (sitios de restricción). Estos fragmentos de ADN digeridos son separados mediante electroforesis en un gel de agarosa y luego transferidos a un soporte sólido, que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de nylon (Southern blotting). El ADN inmovilizado en la membrana es luego hibridizado con una sonda de ADN marcada con un isótopo radioactivo o con una sustancia quimioluminiscente, luego la detección de las bandas RFLPs se puede hacer mediante autorradiografía o

quimioluminiscencia (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Genéticamente los marcadores RFLPs son de naturaleza codominantes.

#### ✳ **Marcadores de ADN basados en PCR**

La técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa), desarrollada por Faloona y Mullis (1987), es un método enzimático que permite generar millones de copias de un fragmento de ADN a partir de unas pocas copias. Este procedimiento consta de 3 etapas:

- ✓ Denaturación del ADN: Se lleva a cabo por calentamiento del ADN mediante el aumento de la temperatura (92-95)°C, donde las hebras de la doble cadena de ADN se separan por ruptura de los enlaces de hidrógeno (**Figura 2.6**).
- ✓ Apareamiento de los iniciadores: Es el alineamiento de los iniciadores con los segmentos de ADN cuya secuencia es complementaria a una temperatura que es crítica (35-68)°C.
- ✓ Extensión de las cadenas de ADN: La elongación de la cadena de ADN resultante del apareamiento del iniciador, es realizada por la enzima *Taq* polimerasa a 72°C, añadiendo nucleótidos al extremo 3'.

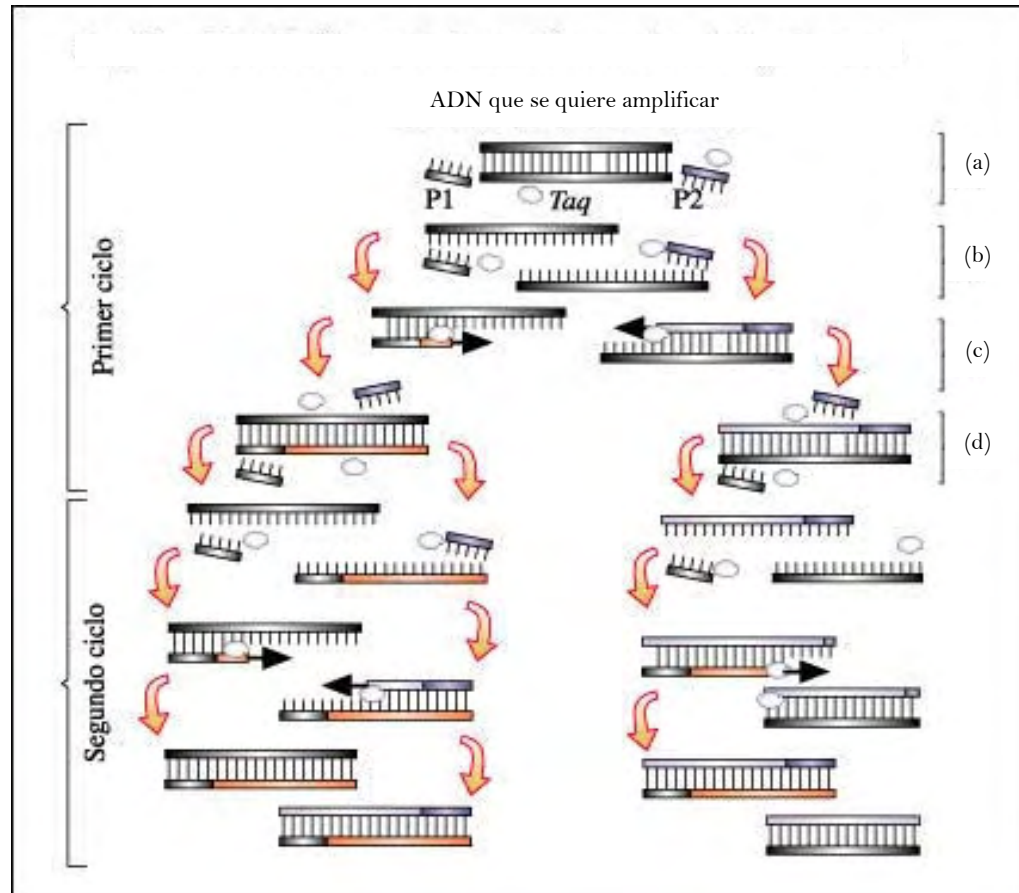
La cantidad de ADN molde se duplica luego de cada ciclo, es decir, luego de 35 ciclos de PCR se obtendrán  $2^{35}$  copias del molde de ADN original.

Dentro de los marcadores moleculares más usados basados en PCR tenemos:

##### a) Marcadores *RAPD*

Del inglés “Random Amplified Polymorphic DNA”, los marcadores RAPD provienen de la amplificación del ADN genómico con un iniciador de secuencia aleatoria (de 8-10 bases); este iniciador puede encontrar su secuencia complementaria a lo largo del genoma en varios lugares y en cadenas opuestas, lo que permite la amplificación del ADN que se encuentra entre ambos sitios. Al tener varias regiones de este tipo, con diferentes tamaños, es posible separarlas mediante electroforesis, obteniéndose así patrones de bandas; el polimorfismo entre los patrones de bandas se observa cuando en la región de apareamiento del iniciador hay una mutación puntual, lo que resulta en ausencia de bandas. (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Las ventajas que presentan estos marcadores son que constituyen un método rápido para detectar polimorfismo, ya que no se requiere de un conocimiento previo de los productos a amplificar; la técnica es aplicable a gran escala y no es costosa; no involucra el uso de material radiactivo

ya que la tinción de geles se hace con bromuro de etidio. Las desventajas son su baja reproducibilidad, su naturaleza dominante, su baja resolución y además problemas de comigración, es decir bandas de igual o similar tamaño, que provienen de lugares distintos del genoma.



**Figura 2.6.** Esquema representativo del ciclo de PCR. (a) Paso 1: Denaturación ( $92^{\circ}$ - $95^{\circ}\text{C}$ ) y componentes de una reacción de PCR: ADN molde, P1 y P2: iniciadores, *Taq*: ADN polimerasa. (b) Paso 2: Hibridación ( $35^{\circ}$ - $68^{\circ}\text{C}$ ). (c) Paso 3: Síntesis ( $72^{\circ}\text{C}$ ). (d) nuevas hebras de ADN. Repetir el ciclo (20-40 veces). Dos ciclos son mostrados en el esquema.

b) Marcadores *SSR*

Del inglés “Simple Sequence Repeats”, los microsatélites consiste en secuencias motivo de 1 a 6 nucleótidos repetidas lado a lado, estas secuencias son más frecuentes, arbitrariamente mejor distribuidas y forman loci genéticos mucho más polimórficos en los genomas de eucariontes que en los procariotes. Constituyen la clase más polimórfica de marcadores moleculares hoy disponible; son muy usados en genotipificación de individuos y construcción de mapas genéticos. Los microsatélites se detectan amplificando el fragmento de ADN que contiene las secuencias sencillas repetidas con un par de iniciadores específicos que flanquean esta región y su detección se realiza en geles de poliacrilamida o en geles de agarosa especial de alta resolución (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Dentro de las ventajas atribuidas a los microsatélites destaca su naturaleza codominante, su alta frecuencia y su distribución amplia en todo el genoma, y sus condiciones son altamente reproducibles. La principal desventaja de los microsatélites es el consumo de tiempo que implica el aislamiento y desarrollo de las secuencias flanqueantes específicas, ya que el proceso involucra la construcción de una biblioteca genómica enriquecida, clonación, secuenciamiento de los clones que contienen los fragmentos de interés y un posterior diseño de iniciadores (Areshchenkova, 2000).

c) Marcadores *AFLP*

Del inglés “Amplified Fragment Length Polymorphism”, en la técnica de AFLP el ADN genómico es digerido con una enzima de corte raro, *EcoRI* (G/AATTC) y con otra de corte frecuente, *MseI* (T/TAA). A los fragmentos de ADN digeridos se les ligan adaptadores de secuencia específica complementaria a los iniciadores a emplear. Luego se realizan dos tipos de amplificación. La primera es una “pre-amplificación”, donde se utilizan los iniciadores (*EcoRI* y *MseI*) que llevan un nucleótido selectivo, con lo que se obtiene un producto para la amplificación selectiva pero cada iniciador contará con 3 nucleótidos selectivos en vez de uno, restringiendo así, el número de fragmentos de ADN amplificados. Al último, los productos de amplificación son separados en geles de poliacrilamida al 6% y visualizados mediante autorradiografía, tinción argéntica, o método fluorescente. El polimorfismo de los marcadores AFLP entre individuos, se detecta con la presencia o ausencia de los fragmentos digeridos y amplificados. Las ventajas de estos marcadores son que generan una gran cantidad de marcadores polimórficos por ensayo, detectan un gran número de loci (mayor cobertura genómica), requieren poca cantidad de ADN, no es necesario un conocimiento previo del genoma en estudio y son altamente reproducibles. Dentro de las desventajas de los AFLP es que son marcadores dominantes, y que el desarrollo de la técnica es de costo muy alto.

### 2.6.3 Marcadores *NBS*

Del inglés “Nucleotide Binding Site”, la técnica del perfil NBS reconoce genes de resistencia (genes *R*) y análogos de genes *R* (RGAs) por usar iniciadores degenerados que son homólogos a las secuencias conservadas en el dominio NBS (sitio de unión nucleotídica) de la clase NBS-LRR (NBS y repeticiones ricas en leucina) de genes de resistencia a la enfermedad en plantas. Estos iniciadores son diseñados específicamente por reconocer un número largo de miembros de familia de genes NBS-LRR (van der Linden *et al.*, 2004).

La técnica ya ha sido usada con éxito en lechuga, papa, tomate, manzana, y cebada por generar perfiles de marcadores multilocus reproducibles altamente enriquecidos por genes *R* y RGAs (van der Linden *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005; Brugmans, 2005; Syed *et al.*, 2006). Muchas de las bandas del perfil NBS mostraron niveles significantes de similitud con secuencias conocidas del dominio NBS presente en genes *R* y RGAs de varias especies, lo que sugiere que el perfil NBS puede generar marcadores polimórficos del tipo RGA con relativa facilidad y altamente ligados a genes de resistencia conocidos o a loci de caracteres cuantitativos (QTL) en muchas especies (Hayes y Saghai Maroof, 2000).

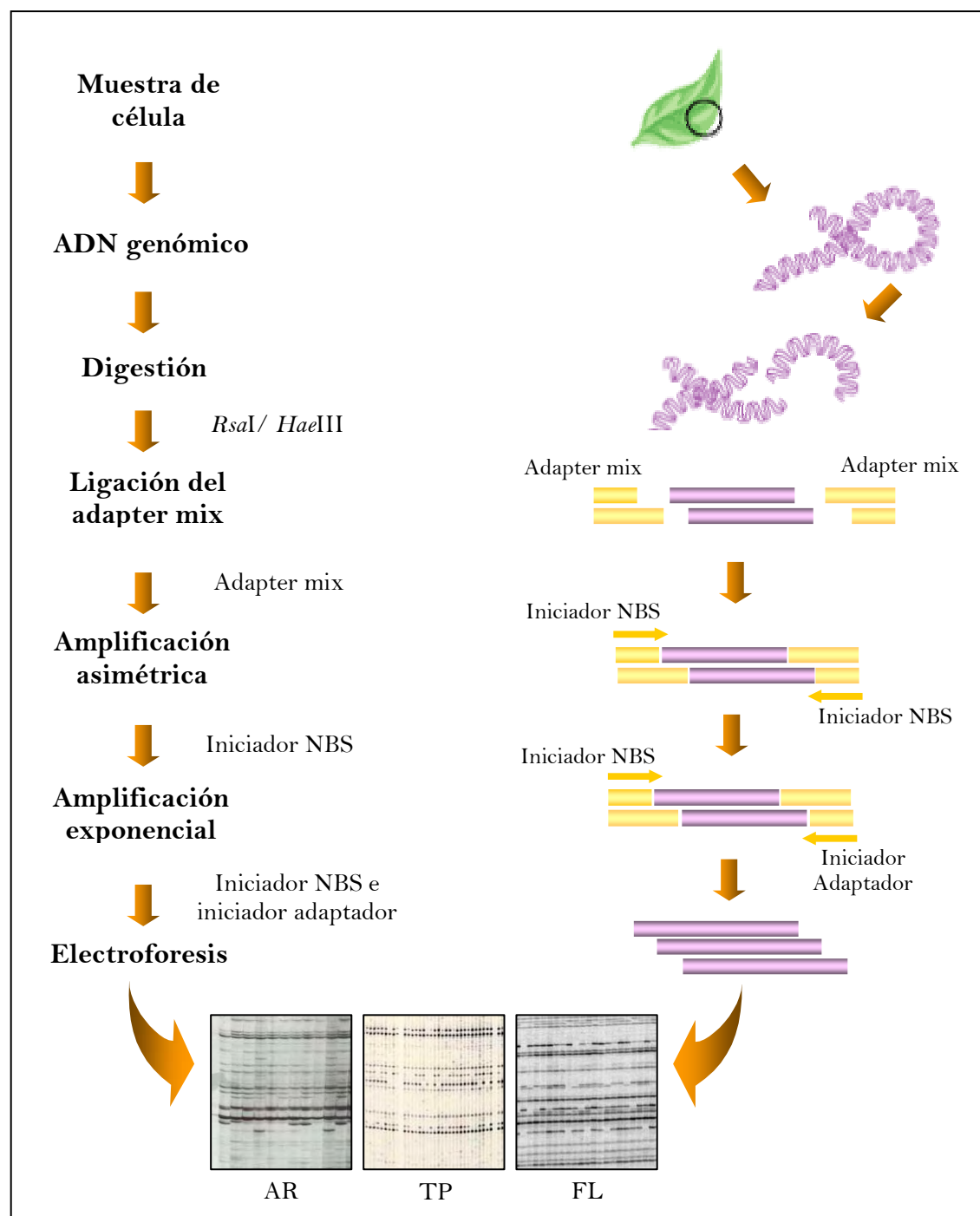
Es así, que las secuencias amplificadas vía PCR, son conocidas como análogos de genes de resistencia (RGA). Se ha probado la utilidad de estos fragmentos RGAs, ya que sirven como marcadores en la construcción de mapas genéticos donde ya se conocen numerosas regiones cromosómicas en diferentes especies de cultivo de genes de resistencia conocidos, especialmente a un carácter de importancia agronómica como la resistencia a enfermedades. En muchos casos, el mapeo de estos fragmentos RGA ha requerido su clonamiento, a fin de encontrar polimorfismo genético en ellos, para luego ser convertidos en marcadores moleculares que podrían ser usados en poblaciones segregantes. La técnica envuelve tres pasos principales (**Figura 2.7**):

- ✓ Digestión del ADN y Ligación de adaptadores: el ADN genómico es digerido con enzimas de restricción de corte frecuente (*RsaI*, *HaeIII*, *AluI*) en un sitio de reconocimiento de 4 nucleótidos, que generan fragmentos de una longitud promedio de 300-400 pb. Luego, los adaptadores de doble hebra son ligados a los extremos de los fragmentos de restricción; estos adaptadores consisten de un oligo largo con una secuencia similar al iniciador adaptador y un oligo corto que está bloqueado por un grupo amino en el extremo 3', cuya función es impedir la elongación por la *Taq* polimerasa.

- ✓ Amplificación de los fragmentos digeridos: En este paso, dos tipos de amplificación son realizados. La primera es conocida como amplificación “asimétrica”, donde sólo el iniciador de dominio específico (NBS) es apareado debido a la secuencia complementaria con los adaptadores y los sitios de restricción, y luego elongado por la *Taq* polimerasa resultando recién en un sitio de apareamiento para el iniciador adaptador, previniendo así la amplificación de fragmentos adaptador-adaptador. La segunda es llamada amplificación “exponencial” donde sólo se encarga de reproducir fragmentos NBS específicos, en combinación con la *Taq* Hotstart se asegura una alta especificidad. En esta etapa, el iniciador NBS puede ser marcado radioactivamente o no ser marcado. En consecuencia la amplificación dependerá altamente de la selectividad y especificidad del iniciador NBS proveniente del PCR asimétrico para la obtención de resultados reproducibles.
- ✓ Análisis del gel: Finalmente los fragmentos del PCR exponencial son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes, para detectar las bandas polimórficas y visualizar mejor la separación de los fragmentos, que pueden lograrse mediante:
  - \* Autorradiografía, si se emplean radioisótopos.
  - \* Tinción con nitrato de plata.
  - \* Lectura de sustancias quimioluminiscentes a través de un programa informático, si se sigue el método fluorescente.

Desde que el perfil NBS, fue desarrollado por van der Linden *et al.* (2004), varios marcadores en genes de resistencia y sus análogos (RGAs) han sido producidos, por lo cual esta técnica se considera más informativa incluso que la técnica de AFLP. Entre las ventajas del perfil NBS se tiene que es una herramienta efectiva para producir marcadores fuertemente ligados a genes que confieren resistencia a patógenos específicos, es muy útil para identificar nuevas fuentes de resistencia en germoplasma así como para la identificación de variedades, especialmente de cultivos con fuerte enfoque en mejoramiento de la resistencia a la enfermedad.

Una reciente ventaja de la técnica NBS, ha sido su utilidad en la expresión de genes *R* funcionales usando ADNc (ADN complementario) derivado de ARN (Brugmans, 2005), lo que confirma que la sensibilidad del perfil NBS es muy alta para detectar genes *R* activos en una mezcla compleja de genes. Por ende, el polimorfismo de los fragmentos NBS entre individuos,



**Figura 2.7.** Esquema que muestra los principales pasos de la técnica NBS.



se detecta con la presencia o ausencia de los fragmentos digeridos y amplificados. Con el perfil NBS se obtiene patrones de bandas en número de 50-70 por vez, lo que facilita los estudios de mapeo y genotipificación (“fingerprinting”), es decir, al igual que los AFLP, se explota al máximo la tasa de polimorfismo que presenta el organismo en estudio.

## 2.7 Análogos de genes de Resistencia (RGAs) en papa

Los análisis de secuencias revelan que los genes *R* están altamente conservados entre las especies de planta. Varias clases de genes *R* son catalogados de acuerdo a los dominios de proteínas que ellos codifican (Dangl y Jones, 2001). La clase más larga (aproximadamente 75%) cae en la clase NBS-LRR, que codifica dominios de sitio de unión nucleotídica (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Los genes *R* de la clase NBS-LRR pertenecen a una familia de genes altamente conservados y son abundantes en genomas de plantas. Así por ejemplo, en el genoma de *A. thaliana* hay aproximadamente 200 secuencias NBS-LRR (Meyers *et al.*, 2003), y en el genoma del arroz cerca de 600 secuencias NBS-LRR (Monosi *et al.*, 2004). Los NBS-LRR de los genes *R* están relacionados con la función del reconocimiento del patógeno y la iniciación subsecuente de una respuesta de defensa (Jones y Jones, 1997; van der Biezen *et al.*, 2000).

Separación

El dominio NBS, consiste de motivos altamente conservados (P-loop, Kinasa 2 y GLPL) para la unión de ATP o GTP y actividad hidrolítica; mientras que el dominio LRR C-terminal es sospechado por asegurar la activación de la resistencia dependiente del reconocimiento (Tameling *et al.*, 2002). Los motivos comunes dentro del dominio NBS que son altamente conservados a través de las especies, han permitido el aislamiento rápido de análogos de genes *R* (RGAs) al usar PCR con iniciadores degenerados diseñados de estos motivos (Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Leister *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2004; Tanhuanpaa *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; van der Linden *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005).

Fijación del  
gel en ácido  
acético

El mapeo genético revela que mucho de los RGA cosegregan con o están cercanamente ligados a genes de resistencia conocidos o a loci de carácter cuantitativo (QTL), es decir, confieren ambos tipos de resistencia, cualitativa o cuantitativa, a diferentes patógenos (Kanazin *et al.*, 1996; Leister *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1998; Aarts *et al.*, 1998; Geffroy *et al.*, 2000; Gebhardt y Valkonen 2001; Donald *et al.*, 2002; Qiang *et al.*, 2005).

Así la identificación de RGAs representa una estrategia potencial para la amplificación de secuencias de genes candidatos de resistencia. Estas secuencias pueden ser convertidas en marcadores moleculares útiles para MAS (selección asistida por marcadores) o mapeo genético de nuevos genes *R* (Qiang *et al.*, 2005). Así por ejemplo, Donald *et al.* (2002) desarrollaron de secuencias RGA, marcadores CAPS y SCAR que cosegregan con el locus de resistencia a la enfermedad en uva; un similar estudio fue reportado por Deng *et al.* (2000) donde dos RGAs fueron mapeados en una región que contiene genes *R* responsables de la resistencia al virus de la tristeza en naranja (CTV) y de la resistencia al nemátodo; Qiang *et al.* (2005) encontraron marcadores derivados de RGA (marcadores RFLP y STS) por estar asociado a un locus mayor *R* que contribuye a la resistencia del moho polvoriento en rosa castaña. Así mismo, los RGAs, también proveen información acerca de la organización y evolución de genes de resistencia y RGAs en genomas de plantas (Grube *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 2003).

## 2.8 Trabajos Previos

Durante la última década, la conservación de secuencias de genes de resistencia a menudo ha sido usada para aislar RGAs por PCR, con iniciadores degenerados diseñados de los motivos altamente conservados de las regiones NBS de los genes *R* caracterizados. Los RGAs han sido aislados y mapeados en muchas especies de plantas, usando primero este método, como en soya (Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996), papa (Leister *et al.*, 1996), maíz (Aarts *et al.*, 1998), lechuga (Shen *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999), cereales (Pan *et al.*, 2000), algodón (He *et al.*, 2004); comprobando en muchos casos, que los RGAs clonados a menudo están ligados genéticamente cerca de los genes de resistencia o cerca de QTLs (Aarts *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1998; Speulman *et al.*, 1998; Geffroy *et al.*, 2000; Gebhardt y Valkonen, 2001; Qiang *et al.*, 2005), y proveen genes candidatos o marcadores útiles para la selección de marcadores asistidos (MAS).

Aunque el uso de iniciadores degenerados para amplificar nuevos RGAs es muy útil para detectar y clonar genes *R*, es a menudo laborioso, ya que involucra el clonamiento y secuenciamiento de los fragmentos después de lo cual, un polimorfismo ha de ser identificado antes que el fragmento pueda ser genéticamente mapeado. Es por ello que, Hayes y Saghai-Maroo (2000) y más recientemente van der Linden *et al.* (2004), propusieron nuevas estrategias para generar polimorfismo y específicamente amplificar motivos conservados; donde el uso de iniciadores degenerados que anclan en motivos específicos NBS en combinación con adaptadores y basados en técnicas de amplificación, crea un modelo complejo que contiene diversos fragmentos RGA. De esta manera, la técnica del perfil NBS mostró ser

una estrategia altamente efectiva en formar marcadores polimórficos con homología alta a RGAs y genes *R* en distintas especies, por usar iniciadores degenerados que son homólogos a las secuencias conservadas de varios motivos estructurales dentro del dominio NBS de genes *R* en plantas.

Calenge *et al.* (2005) usaron el perfil NBS para identificar y mapear RGAs en una población segregante en manzana, y demostraron la eficiencia del método para generar marcadores RGA homólogos a los genes NBS/LRR. La cosegregación de RGAs específicos y loci *R* y/o QTL envueltos en la resistencia a la enfermedad ha sido reportado (Raman *et al.*, 1999; Hunger *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003), y sugieren que el perfil NBS puede ser una poderosa herramienta para el desarrollo de marcadores ligados a loci de resistencia.

Mantovani *et al.* (2006) utilizaron la técnica del perfil NBS para explorar la diversidad genética en accesiones de trigo, como un paso preliminar en el uso de mapeo por asociación para identificar genes o QTLs que afecten la tolerancia de este cultivo a enfermedades fúngicas. Ese mismo año, Syed *et al.* (2006) emplearon las técnicas de AFLP, SSAP y del perfil NBS para comparar tres tipos de marcadores en su accesibilidad y distribución genómica en lechuga, y obtener una diversidad de diferentes marcadores moleculares en la construcción de un versátil mapa de ligamiento.

Malosetti *et al.* (2007) aplicaron el perfil NBS para identificar marcadores ligados a la resistencia al tizón tardío mediante un nuevo aprovechamiento modelo-mezclado para el mapeo de asociación en especies de plantas. Ellos probaron la consistencia de QTLs identificados por este nuevo modelo y dos marcadores fueron reconocidos por ser potencialmente útiles en la selección para resistencia al tizón tardío en papa.

Brugmans *et al.* (2008) aprovecharon la técnica del perfil NBS para generar RGAs y mapear genéticamente estos fragmentos con otros marcadores del mapa ultra denso en papa y detectar grupos de genes *R* conocidos o nuevos grupos de genes *R*; así también en demostrar las diferencias en la transcripción de genes *R* entre tejidos y genotipos con ADNc generado del ARN de diferentes tejidos.

Por otro lado, QTL para resistencia cuantitativa al tizón tardío, han sido identificados y mapeados en un número de poblaciones experimentales de papa diploide, usando marcadores basados en PCR (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Sandbrink *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Trognitz *et al.*, 2001;

Visker *et al.*, 2003a) y en una población tetraploide (Meyers *et al.*, 1998). En todos estos experimentos, los QTLs para resistencia al tizón tardío han sido identificados en los 12 grupos de ligamiento o cromosomas de la papa. Bormann *et al.* (2004), caracterizaron dos poblaciones de papa tetraploide *S. tuberosum*, basados también en marcadores de PCR, los cuales han sido previamente reportados en mapas genéticos de poblaciones diploides por contener algunos factores que controlan la resistencia cuantitativa o cualitativa o ambas, a patógenos.

## 2.9 Resistencia al tizón tardío en *S. paucissectum*

En la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia al tizón tardío en *S. paucissectum*, el centro internacional de la papa (CIP), con sede en Lima-Perú, ha reportado trabajos precedentes, donde se observaron variadas reacciones ante la infección de *P. infestans*, que sugieren la existencia de genes mayores y poligenes en esta especie silvestre diploide.

En 1982, Ochoa colectó dos accesiones de *S. paucissectum* (pcs 762126 y pcs 762124, originarias del Departamento de Piura-Perú), miembro del clado *Piurana* (clado 3), de 5000 y 1000 semillas respectivamente. Observó que las dos accesiones exhibían una fuerte resistencia al tizón tardío en su hábitat natural, y fueron mantenidas desde entonces en el Banco de Germoplasma del CIP para su posterior caracterización como nuevas fuentes de resistencia contra *P. infestans*.

En el 2001, Orrillo evaluó la resistencia al tizón tardío en dos accesiones (entradas) de *S. paucissectum* (pcs 762126 y pcs 762124) en campo, en dos localidades del Perú (Comas y Oxapampa). Las dos accesiones fueron obtenidas como semillas verdaderas de la colección del germoplasma del CIP, y 40 genotipos (clones) de cada accesión fueron establecidos *in vitro*. La **Figura 9.1** resume los valores promedio del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) de las dos entradas de *S. paucissectum* expuestos al tizón tardío bajo las condiciones de campo endémicas en Comas y Oxapampa, con respecto a dos controles fuertemente establecidos de “Chata Blanca” (S, susceptible) y LBr-40 (R, resistente). Las dos accesiones mostraron variación cuantitativa en ambas localidades pero se diferenciaron en su distribución fenotípica. Una de las accesiones, pcs 762126, mostró un rango más amplio de variación fenotípica de genotipos resistentes en ambas localidades, mientras que la accesión pcs 762124 mostró un rango de variación fenotípica de genotipos susceptibles.

Posteriormente, ese mismo año, ensayos de hojas sueltas fueron realizados con diferentes combinaciones de aislamientos de *P. infestans* y las dos entradas de la serie *Piurana* para evaluar la presencia de genes *R* conocidos o nuevos genes *R*. Una raza 0 (PE84006) y tres aislamientos complejos (POX-067, PCO-093 y PCO-002) fueron usados como inóculo. La accesión, pcs 762126, mostró variación cualitativa para la resistencia, típicamente asociada con genes mayores, razón por la que se la consideró como donador de resistencia en una futura progenie segregante.

En el 2002, Salazar en un primer intento para asociar un rasgo marcador de resistencia a tizón tardío en *S. paucissectum*, trabajó con la accesión pcs 762126 de 40 genotipos mediante la técnica AFLP. Analizó que la accesión pcs 762126 presentó bajo polimorfismo (324 marcadores AFLP polimórficos) comparado con otras poblaciones estudiadas y germoplasma cultivado, y encontró que sólo cinco marcadores fueron significativamente asociados con la resistencia.

De esta manera, una nueva estrategia es planteada para analizar la resistencia al tizón tardío así como la segregación de alelos marcadores asociados con esta resistencia en una pequeña progenie derivada de *S. paucissectum*, del cruce entre un genotipo altamente resistente y un genotipo susceptible basados en una amplia distancia genética, provenientes de cada una de las accesiones de *S. paucissectum*.

---

# Materiales y Métodos

El desarrollo experimental del presente trabajo, se realizó en el laboratorio de Biotecnología Aplicada, Marcadores Moleculares I, del Centro Internacional de la Papa (CIP), La Molina, Lima-Perú.

## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Material biológico

La población de papa utilizada en el presente estudio comprende individuos F1 de la especie silvestre diploide *Solanum paucisectum* ( $2n=2x=24$ ), miembro de la serie *Piurana* (clado 3), se encuentra conservada en el Banco de Germoplasma *in vitro* en el Centro Internacional de la Papa. La obtención de los genotipos parentales fue realizada por la Bióloga Matilde Orrillo (CIP) (**Apéndice 1, Figura 9.1**).

### 3.1.2 Material de laboratorio

- ✂ Algodón
- ✂ Bandejas de plástico (Manna)
- ✂ Botellas de vidrio de 1L (Pirex®)
- ✂ Cajas de tecnopor
- ✂ Cajas para guardar vidrios con películas de radioactividad
- ✂ Cinta adhesiva
- ✂ Cinta selladora de placas (Parafilm)
- ✂ Cinta envolvente Saram Wrap™ (Dow Chemical Company Indianapolis, Ind.)
- ✂ Combitips de 1 µl y 10 µl (Eppendorf)
- ✂ Espátulas, pinzas y tijeras de metal
- ✂ Espaciadores de 0.4 mm
- ✂ Gradillas y soportes para tubos
- ✂ Grasa silicona (Dowcorning®)
- ✂ Guantes de vinilo y látex (Safeskin)
- ✂ Hojas de bisturí # 10 (Feather)
- ✂ Jeringas y agujas hipodérmicas de 10 ml (Terumo)

- ✖ Juego completo de pipetores graduables (Gilson y Eppendorf)
- ✖ Magentas plásticas con tapa de 60 x 60 x 100 mm (PhytatrayII, SIGMA)
- ✖ Magnetos (Fisher Scientific)
- ✖ Matraz Kitazato de 1000 ml (Pirex®)
- ✖ Mechero
- ✖ Moldes acrílicos para preparar geles de agarosa
- ✖ Papel de aluminio
- ✖ Papel filtro Whatman 4
- ✖ Papel fotográfico positivo (Typon® TR-DO 18 Promega)
- ✖ Papel tissue (Kimwipes®)
- ✖ Papel toalla
- ✖ Peines para geles de agarosa y acrilamida
- ✖ Película para Rayos X (Kodak)
- ✖ Pilonos y morteros de porcelana (Corn)
- ✖ Pipetas graduadas de 10ml (Corning) y Pipetas Pasteur
- ✖ Placas de policarbonato de 96 pocillos para PCR (MJ Research)
- ✖ Placas de vidrio de 42x33x0.5 cm y de 40x33x0.5 cm
- ✖ Placas petri 100 x 15 mm (Fisherbrand)
- ✖ Plumones marcadores de tinta indeleble
- ✖ Probetas, frascos, beakers y erlenmeyers de vidrio (Pirex®) y de plástico (Nalgene)
- ✖ Puntas plásticas (tips) de 10, 200 y 1000 µl de capacidad (Daigger, Sigma, Oxford y Fisher Scientific)
- ✖ Repetitivo (Eppendorf)
- ✖ Termómetro (Fisherbrand)
- ✖ Tubos de ensayo Pirex® N° 18 con tapa
- ✖ Tubos de centrifuga 50 ml falcon (Corning)
- ✖ Tubos en tiras y tapas en tiras para PCR (MJ Research)
- ✖ Tubos para microcentrifuga de 0.6, 1.7 y 2.0 ml de capacidad (Sigma)

### **3.1.3 Equipos de laboratorio**

- ✖ Agitadores magnéticos (Fisher Scientific y Thermolyne, modelo SP46925)
- ✖ Agitador incubador (New Brunswick Scientific, modelo G-25)
- ✖ Agitador rotatorio (New Brunswick Scientific)
- ✖ Balanzas analíticas (Ohaus, modelo Ga110 y Sartorius, modelo Ba110)
- ✖ Baño maría (Lauda, modelo RMT6)

- ✖ Caja de luz (Life Technologies, modelo The Illuminator)
- ✖ Cámara de electroforesis horizontal (Life Technologies, modelo H4)
- ✖ Cámara de electroforesis vertical para geles de secuenciamiento (Gibco, modelo S2)
- ✖ Cámara de flujo laminar (EACI)
- ✖ Campana extractora de aire (Metálica Fernández y Cía.)
- ✖ Captador digital de imágenes (Epichemi<sup>3</sup> Darkroom)
- ✖ Computadora Gateway compatible, con software Microsoft Office NT
- ✖ Congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Electrolux)
- ✖ Congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$  (Sanyo)
- ✖ Destilador (Wheaton Instruments)
- ✖ Dispensador de medios automático
- ✖ Escáner (AGFA, Snap 1236<sup>S</sup>)
- ✖ Esterilizador de instrumentos
- ✖ Expositor de luz UV (Stratagene, UV Stratalinker 240)
- ✖ Filtro de luz roja (Kodak, GBX-2)
- ✖ Fuentes de poder para electroforesis (Pharmacia Biotech, modelo EPS 3500 y Life Technologies, modelo 250)
- ✖ Horno (Precision Scientific Inc)
- ✖ Horno autoclave (Market Forge, modelo Sterilmatic)
- ✖ Horno microondas (Samsung)
- ✖ Impresora láser (Hewlett Packard, modelo 4050)
- ✖ Incubadora (Precision Scientific)
- ✖ Incubadora para tubos de microcentrífuga (en seco) (Fisher Scientific Brand)
- ✖ Liofilizador Speed Vac<sup>®</sup> Plus (Savant, modelo SC110A)
- ✖ Máquina de hielo (Scotsman)
- ✖ Microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415C)
- ✖ Multicanal Labsystems 5-50  $\mu\text{l}$  y 1-10  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- ✖ Pipetores de 0.05-2.5  $\mu\text{l}$ , 0.5-10  $\mu\text{l}$ , 1-20  $\mu\text{l}$ , 50-200  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- ✖ Potenciómetro (Corning, modelo 240)
- ✖ Purificador de agua (Millipore, Milli-Q plus)
- ✖ Refrigerador de  $4^{\circ}\text{C}$  (Fisher Scientific, modelo Isotemp)
- ✖ Termociclador MJ Research modelo PTC 100 y PTC 200
- ✖ Secadora
- ✖ Trompos de filtración (Sigma)
- ✖ Ultracentrífuga (Beckmann, L8-80M)
- ✖ Vortex



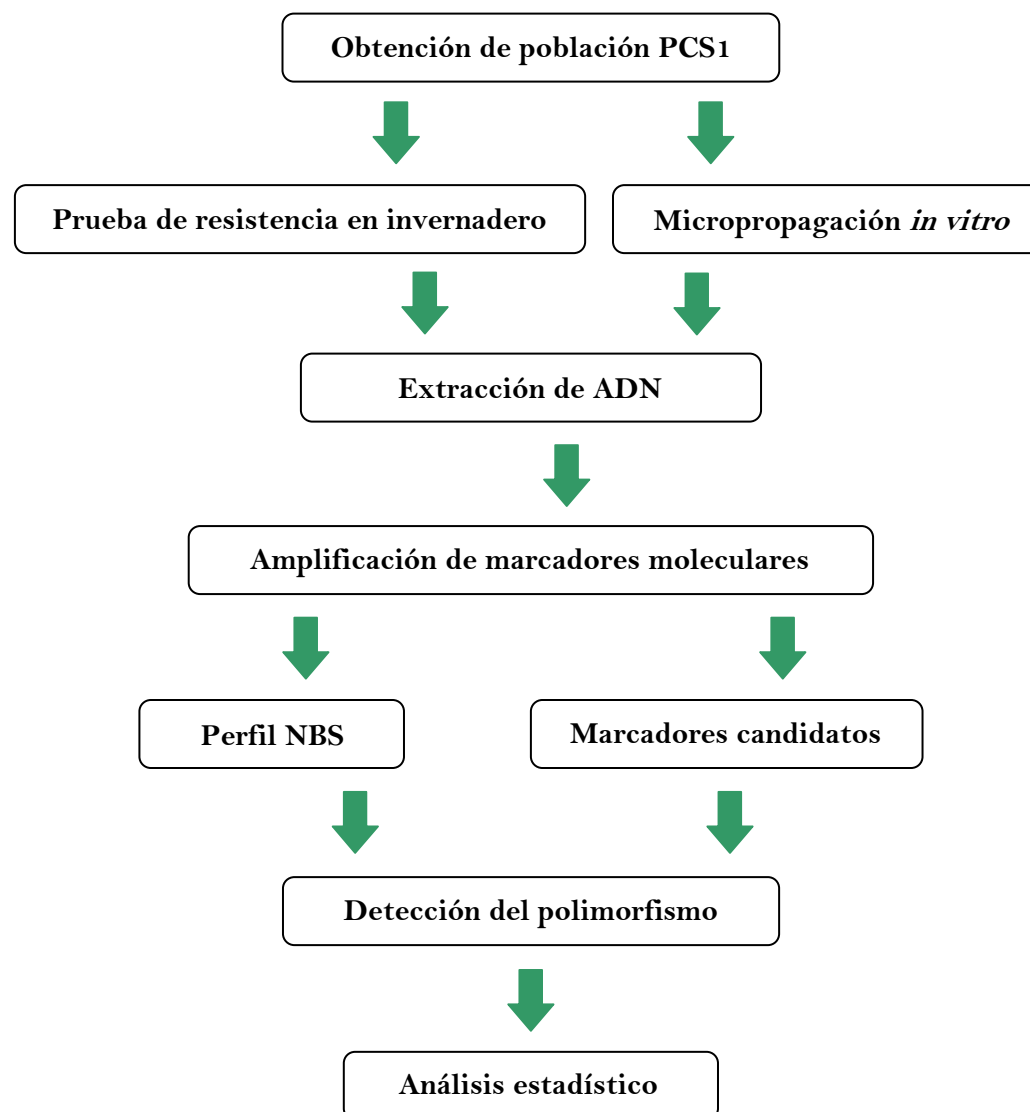
### 3.1.4 Material Químico

- ✧ Aceite mineral (Sigma)
- ✧ Acetato de sodio (Fisher Scientific)
- ✧ Ácido acético glacial 100% (Merck)
- ✧ Ácido bórico (Fisher Scientific)
- ✧ Ácido clorhídrico HCl (Merck)
- ✧ Acrilamida (Sigma)
- ✧ ADN del Fago Lambda (Gibco)
- ✧ Agarosa (Gibco, Ultra pura)
- ✧ Agua destilada y Milli-Q
- ✧ Agua libre de nucleasas, Nuclease Free Water (Sigma)
- ✧ Alcohol 96%
- ✧ Alcohol isoamílico (Sigma)
- ✧ ATP- $\gamma$ P<sup>33</sup> (10  $\mu$ Ci/  $\mu$ l de 2000 Ci/ mmol) (Amersham PLC)
- ✧ Azul de bromofenol (Sigma)
- ✧ Bis-acrilamida (Sigma)
- ✧ Bromuro de etidio (Sigma)
- ✧ Carbonato de sodio (Merck)
- ✧ Cloroformo (Merck)
- ✧ Cloruro de magnesio (Perkin-Elmer)
- ✧ Cloruro de potasio (Sigma)
- ✧ Cloruro de sodio (Merck)
- ✧ CTAB (Aldrich)
- ✧ Deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (invitrogen)
- ✧ Dimetilformamida (Sigma)
- ✧ EDTA (Ácido etilen di-amina tetra acético) (Sigma)
- ✧ Enzima ligasa ADN T4 (invitrogen)
- ✧ Enzima polinucleótido kinasa ADN T4 (invitrogen)
- ✧ Enzimas de Restricción:
  - *AluI* (New England Biolabs)
  - *HaeIII* (New England Biolabs)
  - *RsaI* (New England Biolabs)
  - *MseI* (New England Biolabs)
  - *PstI* (Gibco)
- ✧ Enzima RNAasa (Sigma)

- ✧ Enzima *Taq* ADN polimerasa y solución tampón de almacenamiento (Laboratorio de Biotecnología Aplicada - CIP)
- ✧ Enzima Platinum *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen)
- ✧ Etanol absoluto (Merck)
- ✧ Extran® (Merck)
- ✧ Formaldehído 37% (Fisher Scientific)
- ✧ Formamida (Sigma)
- ✧ Glicerol (Sigma)
- ✧ Hidróxido de sodio NaOH (Merck)
- ✧ Iniciadores:
  - NBS específicos (Invitrogen)
  - Marcadores para PCR (Invitrogen).
- ✧ Isopropanol (Merck)
- ✧ Limpia vidrios (Rain X Super™, Unelko Corporation)
- ✧ Marcador de 50 pb (Invitrogen)
- ✧ Marcador de 100 pb (Invitrogen)
- ✧ Medio de cultivo basal MSA (Sales Murashige y Skoog) (Sigma)
- ✧ Mercaptoetanol (Sigma)
- ✧ Nitrato de plata (Kossodo)
- ✧ Nitrógeno líquido
- ✧ Persulfato de amonio (Sigma)
- ✧ PlusOne Repel-Silane (Sigma)
- ✧ Phytigel (Sigma)
- ✧ Silano de adhesión (Pharmacia Biotech, PlusOne Silane A-174)
- ✧ Soluciones reveladora y fijadora (Kodak GXB, 5X)
- ✧ Solución tampón 10X PCR Buffer II (Perkin-Elmer)
- ✧ Sucrosa (Sigma)
- ✧ TEMED (N,N,N',N'-Tetra-metil etilén di-amina) (Sigma)
- ✧ Tiosulfato de sodio (Merck)
- ✧ Tris (Tris[hidroximetil] amino etano) Sigma 7-9® (Sigma)
- ✧ Urea (Sigma)
- ✧ Xilén cianol (Sigma)

### 3.2 Métodos

La metodología utilizada comprende desde la obtención de la población PCS1 hasta la verificación de genes *R* por ensayos con el patógeno, seguido por la evaluación con la técnica del perfil NBS y de iniciadores para loci candidatos en el desarrollo de marcadores polimórficos (**Esquema 3.1**).



**Esquema 3.1.** Esquema de la metodología utilizada en el presente trabajo.

### 3.2.1 Obtención de la progenie PCS1

La población de papa PCS1, proviene del cruce entre el progenitor femenino (♀) pcs 762126.227 con una extrema resistencia horizontal a *P. infestans* y el progenitor masculino (♂) pcs 762124.236 susceptible a *P. infestans*. Se realizó la germinación bajo condiciones *in vitro*, y luego la progenie PCS1 comprendida de 57 genotipos junto con los progenitores fueron conservados bajo condiciones *in vitro* para su posterior propagación. Para la prueba de folíolos sueltos, los individuos de la progenie F1 y los progenitores provenientes de la colección *in vitro* fueron propagados clonalmente bajo condiciones *in vitro* en medio semi-sólido MSA (**Apéndice 2**), con tres repeticiones por cada genotipo en magentas (PhytatrayII, SIGMA) con la finalidad de obtener explantes de hojas, los que fueron luego incubados en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura 21-23°C, 16 horas luz fotoperiodo, 3000 lux intensidad lumínica y 70% humedad relativa, durante 3-4 semanas y luego transferidos a invernadero para su crecimiento (**Figura 3.1**).

### 3.2.2 Prueba de compatibilidad

La virulencia es la habilidad del patógeno de infectar y reproducirse en la planta. Un análisis fenotípico de resistencia a tizón tardío fue evaluada en los genotipos de la progenie PCS1 dos veces con cada uno de los cuatro aislamientos: una de raza 0 PE84006 (que significa que no tiene genes de virulencia o que es avirulento) y tres aislamientos complejos POX-067, PCO-093 y PCO-002 (que porta una serie de genes de virulencia) de *P. infestans* usando el bioensayo de hojas sueltas (Detached leaf assay) para tasar la presencia de genes *R* nuevos o ya conocidos.

Dos hojas del tercio superior de cada planta (antes de la etapa de floración) fueron colocadas en placas Petri con agar agua al 1.5% en el lado abaxial de cada hoja (**Figura 3.2**). Unos 10 µl de inóculo, conteniendo una suspensión esporangial de 3000 esporangios/ml (antes refrigerados de 5-8°C para promover la liberación de zoosporas), fueron colocados en cada lado de la vena principal de ambas hojas contenidas en una placa petri. Las placas fueron colocadas en oscuridad a 18°C por 1 a 3 horas para promover la liberación de zoosporas y luego fueron incubadas en las cámaras de crecimiento a 18°C, con 12 h de luz y 95% de humedad, para dar las condiciones propicias al desarrollo de la enfermedad. Las lesiones fueron evaluadas cinco días después de la inoculación. Cada genotipo fue evaluado como compatible cuando lesiones expandidas fueron observadas (no expresan genes *R*) e incompatible cuando la infección fue fallida o una respuesta hipersensitiva observada (expresan genes *R*).



**Figura 3.1.** Plántulas de la progenie PCS1 crecidas en invernadero.



**Figura 3.2.** Prueba de inoculación de folíolos con aislamientos de *P. infestans*.

### 3.2.3 Propagación *in vitro* de la progenie PCS1

Para la extracción de ADN y obtención de marcadores polimórficos, la progenie F1 PCS1 provenientes de la colección *in vitro* fue propagada nuevamente bajo condiciones *in vitro*, con la finalidad de obtener explantes de hojas en medio de cultivo MSA, que está conformado por el medio basal MS (Sales Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sucrosa, ácido giberélico, glicina, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina HCl y phytigel. Las 59 líneas, incluidas los padres, fueron sembradas primero en tubos con 5 ml de medio semi-sólido MSA (**Apéndice 2**). Se cortó segmentos de tallo, de aproximadamente 5 mm de longitud, en el que cada segmento contenía un meristemo. Estos fueron inmediatamente cultivados, cuatro segmentos nodales o apicales por tubo y se hicieron tres repeticiones por cada genotipo, los mismos que fueron mantenidos en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura 21-23°C, 70% humedad relativa, un fotoperiodo de 16 horas de luz y 3000 lux de iluminación, durante 3-4 semanas.

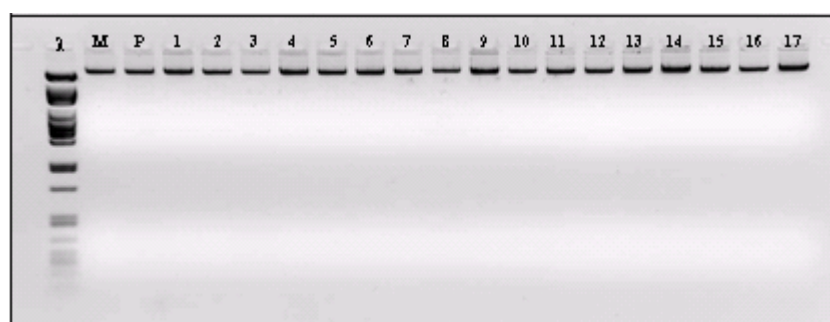
Luego de ese tiempo, se obtuvo plántulas lo suficientemente vigorosas para volver a propagarlas pero ahora en magentas (PhytatrayII, SIGMA) con el propósito de obtener mayor cantidad de ADN en su extracción. Las magentas contenían 30 ml de medio semi-sólido MSA y se cultivaron nueve entrenudos en cada magenta (5 mm de longitud aprox.) con tres repeticiones por cada genotipo, los que fueron luego incubados en cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones controladas, durante 3-4 semanas. A fin de reducir la contaminación por polisacáridos, las plántulas fueron colocadas en oscuridad uno o dos días antes de iniciar la extracción del ADN.

### 3.2.4 Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó del material propagado *in vitro*, 6 semanas después de su cultivo, y se empleó las hojas y tallos de las plántulas, con el fin de obtener una buena cantidad de ADN. Es necesario que el ADN genómico a utilizarse para el perfil NBS sea de alta calidad, para así ser digerido totalmente por las enzimas de restricción, por ello se siguió el protocolo de extracción de ADN CTAB 2X en papa, desarrollado en el laboratorio de biología molecular del CIP (1998). Para más detalle ver el **Apéndice 3**.

### 3.2.5 Cuantificación del ADN

La calidad y la concentración del ADN fueron estimadas por análisis comparativo en la intensidad de la banda que corresponde al ADN genómico de las muestras con la primera banda de un marcador que posee pesos y concentraciones conocidas, en este caso el ADN del fago *lambda* ( $\lambda$ ) cortado con la enzima *Pst*I, cuya banda de mayor peso equivale a 280 ng (concentración de 280 ng/ $\mu$ l de ADN del fago *lambda*). El procedimiento fue el siguiente, se tomó 1  $\mu$ l del ADN genómico diluido en 9  $\mu$ l de tampón de carga SALB X, con el propósito de darle volumen y densidad a la muestra, luego se cargó en un gel de agarosa al 1% y paralelamente a las muestras se carga 10  $\mu$ l del marcador de referencia. La corrida electroforética se realizó en cámaras horizontales a 90 V durante 90 minutos, se utilizó como tampón de corrida TBE X, y se colorea el gel con bromuro de etidio (10 mg/ml). En seguida se procedió a capturar la imagen con el sistema de Epichemi<sup>3</sup> para su posterior cuantificación (Figura 3.3).



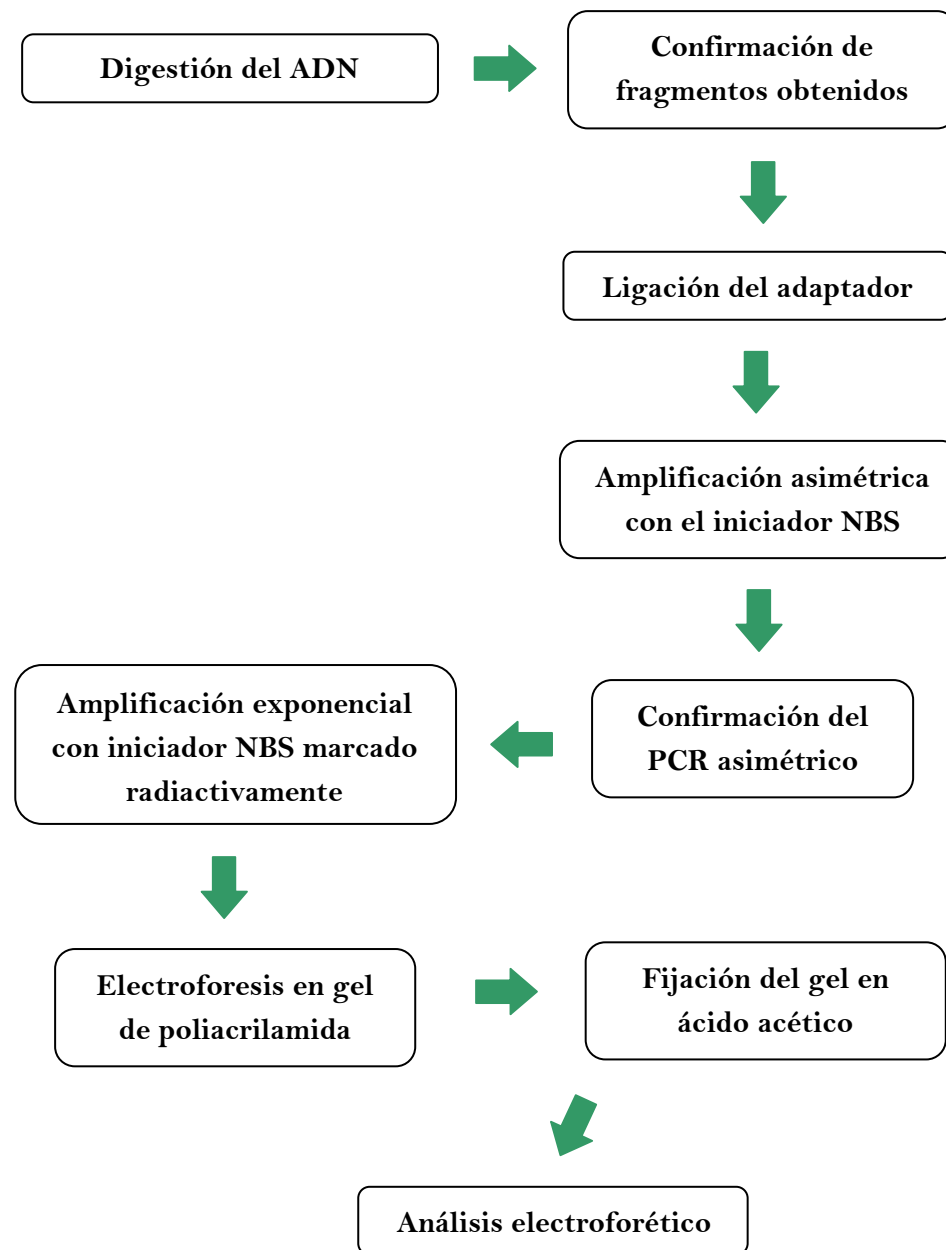
**Figura 3.3.** Cuantificación de ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1%.  $\lambda$ : marcador fago *lambda*, cuya primera banda equivale a 280 ng; M: madre 227 (200 ng); P: padre 236 (200 ng); 1-17: muestras de ADN de la población PCS 1.

### 3.2.6 Dilución del ADN

Se trabajó con una serie de diluciones de cantidades conocidas, a fin de estimar la concentración del ADN. Las muestras fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 50 ng/ $\mu$ l para la técnica NBS y 10 ng/ $\mu$ l para el análisis de marcadores por PCR, usando agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen final de 200  $\mu$ l cada una y se conservaron a 4°C. Las diluciones se realizaron en tiras o “strip” de 250  $\mu$ l de capacidad. Todas las muestras de la progenie PCS1 junto con los parentales fueron utilizadas para obtener fragmentos NBS mediante la técnica NBS y marcadores para loci candidatos mediante el análisis de marcadores por PCR.

### 3.2.7 Técnica del perfil NBS

Se trabajó con el protocolo establecido por van der Linden *et al.* (2004) (**Apéndice 4**).



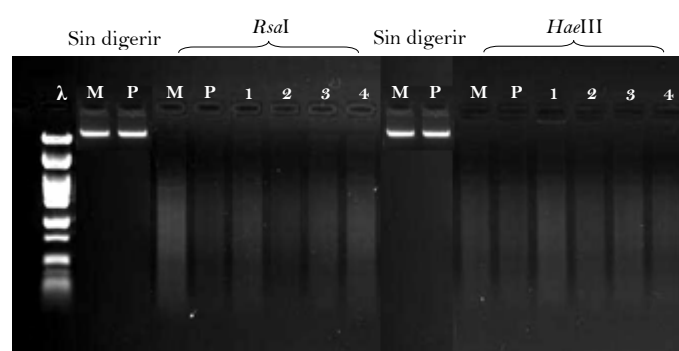
**Esquema 3.2.** Esquema de los pasos desarrollados en la técnica del perfil NBS.



### 3.2.7.1 Digestión del ADN genómico y ligación del adaptador

Dos enzimas de restricción, *RsaI* y *HaeIII*, con un sitio de reconocimiento de cuatro bases (GT/AC y GG/CC) fueron utilizadas para digestión del ADN genómico de los parentales y de la progenie PCS1. Se usó 250 ng de ADN por individuo en el tampón de reacción apropiado, se incubó a 37°C por un total de 3 h; la reacción fue terminada por inactivación al calor a 65°C. La verificación de una buena digestión se visualizó con un *smear* o barrido en una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% (**Figura 3.4**).

Luego, un adaptador fue ligado a los extremos de los fragmentos de restricción; este adaptador está formado por un brazo corto y un brazo largo, donde el extremo 3' de la cadena corta fue bloqueado por la presencia de un grupo amino para evitar su extensión con la *taq* ADN polimerasa, mientras que el extremo 5' fue fosforilado para facilitar la ligación a los extremos de los fragmentos romos (**Apéndice 1, Figura 9.2**). Para más detalle en la metodología de los adaptadores ver **Apéndice 4.2a**.

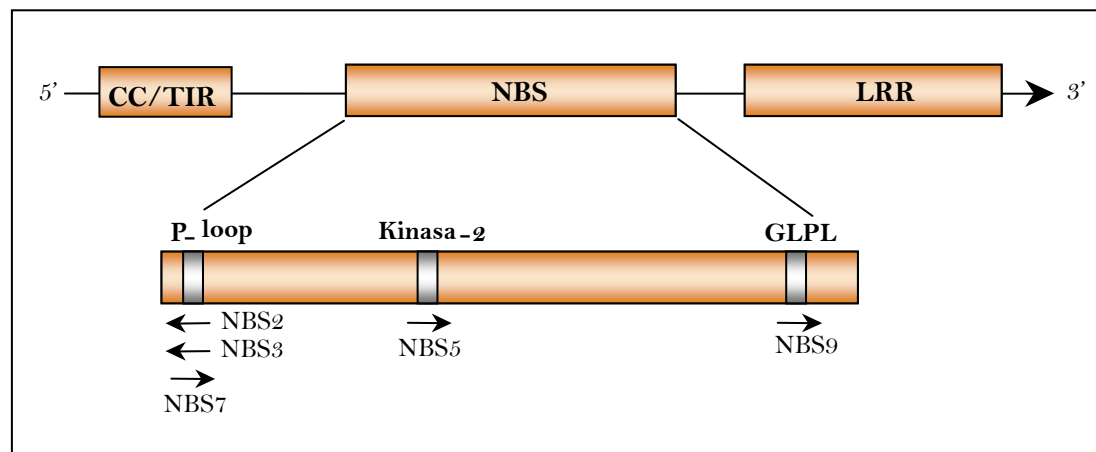


**Figura 3.4.** ADN genómico digerido con dos enzimas de restricción.  $\lambda$ : ADN Lambda digerido con *PstI*; M: *S. paucisectum* 227; P: *S. paucisectum* 236; 1-4: individuos de la población PCS 1.

### 3.2.7.2 Amplificación de los fragmentos

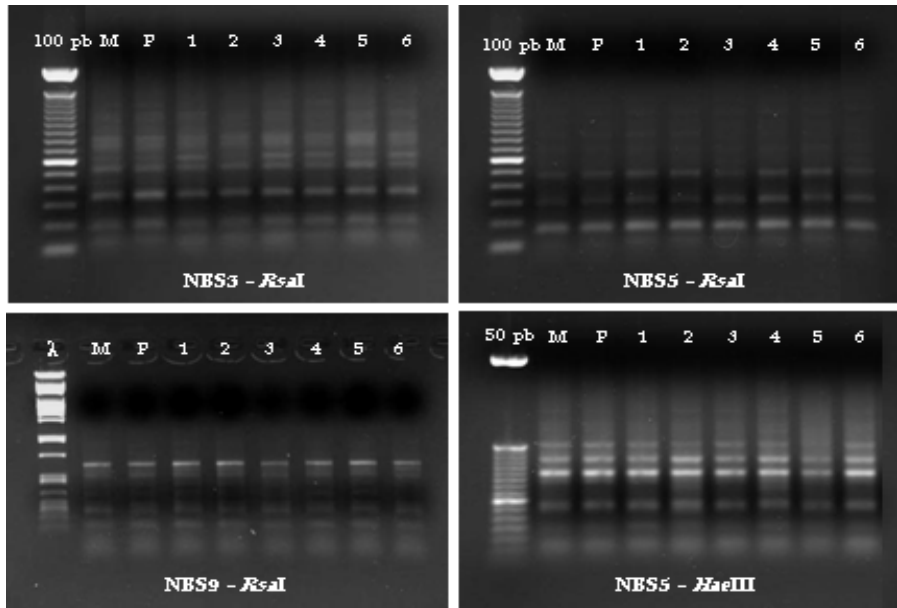
Cinco iniciadores degenerados (NBS2, NBS3, NBS5, NBS7 y NBS9) fueron usados en este estudio de trabajos anteriores (van der Linden *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005). La amplificación de los fragmentos NBS envuelve dos procesos de PCR. Estos iniciadores fueron diseñados del alineamiento de secuencias de ADN de una parte de los motivos conservados P-loop, kinasa-2 y GLPL perteneciendo a la región NBS de genes de resistencia a la enfermedad en plantas. El iniciador NBS5 ancla en el motivo kinasa-2, con dirección al extremo 3' de la región NBS. NBS2, NBS3 y NBS7 son iniciadores diseñados en el consenso del motivo P-loop,

localizados en el extremo 5' del dominio NBS. NBS2 y NBS3 apuntan hacia el extremo 5' del NBS; mientras que, NBS7 apunta al extremo 3'. El iniciador NBS9 esta diseñado en el consenso del motivo GLPL, con dirección al extremo 3' (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Representación esquemática del sitio de unión nucleotídica (dominio NBS) de los genes de resistencia (*R*) a la enfermedad. Posiciones relativas y orientación de los iniciadores degenerados que anclan en motivos altamente conservados dentro de la región NBS son indicadas.

En el primer PCR lineal, el iniciador adaptador (10 pmol/μl) no puede ser apareado y sólo cuando el iniciador de dominio específico NBS es apareado y elongado por la *Taq* polimerasa, el sitio de apareamiento para el iniciador adaptador es generado. Esto previene la amplificación de fragmentos adaptador-adaptador. Aunque los iniciadores degenerados tienen una apreciación de dar resultados variables, trabajos anteriores muestran alta reproducibilidad de estos PCRs, comparable incluso a AFLP (van der Linden *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005). Para verificar una correcta amplificación del PCR asimétrico, alícuotas de 15 μl de cada muestra fueron examinadas en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V por una hora con tampón TBE X circulante, y las bandas fueron visualizadas con radiación UV, lo que resulta en un *smear* con fragmentos de diferentes tamaños en rangos de 100-1000 pb dependiendo del iniciador usado y la fuente de ADN (**Figura 3.6**). Luego, se diluye la cantidad restante de las muestras 1:10 en tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>.



**Figura 3.6.** Confirmación de los productos de la amplificación asimétrica (primer PCR) con diferentes combinaciones iniciador NBS/enzima en agarosa al 1%. λ: ADN Lambda digerido con *Pst*I; 50 pb: marcador de 50 pares de bases; 100 pb: marcador de 100 pb; M: *S. paucissectum* 227; P: *S. paucissectum* 236; 1-6: individuos de la población PCS 1.

Los iniciadores NBS específicos fueron marcados con fósforo radiactivo ( $P^{33}$ ) para la visualización de los fragmentos NBS empleados en la amplificación exponencial. Esto permite que sólo una de las dos hebras de ADN amplificadas sea observada, proporcionando una mejor resolución en la visualización de los fragmentos NBS. Las secuencias de los iniciadores son mostradas en las **Tablas 3.1 y 3.2**. Las condiciones de amplificación para los dos PCR se detallan en el **Apéndice 4**.

**Tabla 3.1.** Combinaciones iniciador NBS específico/enzima

Iniciador	<sup>a</sup> Secuencia del Iniciador 5'→ 3'	Ta(°C)	Enzima
NBS2	GTWGYTTTICCYRAICCISSCAT	60	<i>Rsa</i> I <i>Hae</i> III
NBS3	GTWGYTTTICCYRAICCISSCATICC	60	<i>Rsa</i> I <i>Hae</i> III
NBS5	YYTKRTHGTMITKGATGATGTITGG	55	<i>Rsa</i> I <i>Hae</i> III
NBS7	ATTGTTGGRATGGGMGGIMTIGG	55	<i>Rsa</i> I <i>Hae</i> III
NBS9	TGTGGAGGRTTACCTCTAGC	55	<i>Rsa</i> I <i>Hae</i> III

<sup>a</sup> Las secuencias son codificadas de acuerdo a la Unidad Internacional de Bioquímica: W (A o T); Y (C o T); R (A o G); S (G o C); K (G o T); H (A, C o T); M (A o C); I Inosina.

Tabla 3.2. Secuencia nucleotídica de los adaptadores

- Adaptador del brazo largo:
5'-ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA- 3'
- Adaptador del brazo corto:
5'-TGGGATCTATACTT- 3'
- Iniciador adaptador:
5'-ACTCGATTCTCAACCCGAAAG- 3'

3.2.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los productos de PCR marcados fueron separados por electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%, y los fragmentos individuales fueron visualizados por autorradiografía. En todos los casos se realizó una pre-electroforesis a 1600 V por 30 minutos con el objeto de eliminar el exceso de urea en el gel. Los detalles de la preparación de los geles de poliacrilamida se encuentran en el **Apéndice 6**.

3.2.7.4 Obtención de la autorradiografía

Se realizó nuevamente el ensamblaje de las placas de vidrio, pero esta vez con una película de rayos X (Kodak) entre las placas. Luego se procedió al revelado de la película. (**Apéndice 4**). El perfil NBS con las 7 combinaciones iniciador/enzima y los genotipos de la progenie PCS1 fueron repetido dos veces, donde sólo las bandas marcadoras reproducibles fueron reconocidas y el patrón de segregación registrado para su posterior análisis.

3.2.8 Análisis de marcadores de genes candidatos basados en PCR

La progenie PCS1 fue analizada con 15 marcadores de ADN localizados en algunos de los grupos de ligamiento de la papa basada en análisis de PCR (**Tabla 3.3, Figura 2.5**). Estos marcadores fueron elegidos basados en la cercanía que tienen a la familia de genes del tipo NBS-LRR o derivados de estos y al ligamiento a QTL para resistencia a tizón tardío. Los marcadores *BA121ot7*, *NL25* y *NL27* fueron derivados de los genes tipo NBS-LRR. Los marcadores *CosA*, *GP179* y *GP125* están cercanamente ligados a la familia de genes tipo NBS-LRR. El marcador *57t3* marca cerca al loci PR *Osm11*. La información y secuencia de los iniciadores es mostrada en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Lista de iniciadores específicos usados en la resistencia a tizón tardío en papa

GL	Marcador	Secuencia del iniciador (5'→3')	Producto PCR (pb)	# ciclos	Ta (°C)
II	GP23	CAT AGC AGA CAA TGT TGA GC TCA TTA ATT TCC CAG TAA G	1200	30X	52
IV	GP180	TCC ACC CCT GGA TTC AAG AA TCA AAC TCC TTC ACA AAG CA	400	35X	60
V	CosA	CTCATTCAAAATCAGTTTTGATC GAATGTTGAATCTTTTTGTGAAGG	250	35X	55
	CP113	CTTACAGTCGCCGTAT GCCTTACAGTCGCCGTAT	900	-	-
	GP21	GGTTGGTGGCCTATTAGCCATGC AGTGAGCCAGCATAGCATTACTTG	1240	30X	60
	GP179	GGTTTTAGTGATTGTGCTGC AATTTCAGACGAGTAGGCACT	500	30X	58
	BA121o1t7	CAT AAA GTC TTG CAG AGT TCT CAA GGA TTT GGA GCA CCG GGT TGT	233	35X	55
VIII	BA47f2	TAACCAACATTATCTTCTTTGCC GAATTTGGAGAGGGGTTTGCTG	650	-	-
	57t3	CAA TCC GTT GGA GTT TAG ACG ATC GAA GAG GAG AAC CTT GGT GGA TGG	800	35X	60
	GP125	AGC AGC TCT GAT GGC AAT GC GAG CCT AGC TGC CCA GCT TC	1000	30X	59
	NL25	TAT TGT TAA TCG TTA CTC CCT C AGA GTC GTT TTA CCG ACT CC	1000	40X	60
	NL27	TAGAGAGCATTAAAGAAGCTGC TTTTGCCTACTCCCGGCATG	1200	35X	62
XI	C2AT	TCTGTTCCAGTGATACAATGAGGAGG ACTGAAGAGTGAGATTCCGGTGGAG	1200	40X	60
	LE-HB-t7	CTGTATAGTTCTGCTGATGT GGATTTTTGAAGGGTTCAGG	527	40X	55
	CP60	CAGCCTACCGCGAAAGTGCCTTCG GCCAACCCACGAGTTTCTCACTGAC	-	35X	58

3.2.8.1 Optimización de iniciadores candidatos

Se optimizó las temperaturas de apareamiento (Ta) de cada par de iniciadores, puesto que no daban especificidad a la reacción, basándonos en las condiciones establecidas de Bormann *et al.* (2004). Para ello, 12 T° fueron probadas en el termociclador de gradiente MJ Research PTC-200™ y se trabajó con los parentales (762126.227 (R) y 762124.236 (S)) y dos individuos de la progenie PCS1 de características fenotípicas opuestas (presencia/ausencia del fragmento). Luego, se procedió a estandarizar las condiciones de reacción de PCR, donde el número de ciclos y el tiempo en cada etapa de amplificación de un PCR fueron ensayados hasta obtener el fragmento de tamaño esperado de los iniciadores (Apéndice 5).

### 3.2.8.2 Amplificación de los productos por PCR

Con las condiciones estandarizadas para la PCR y la reacción, se amplificaron los fragmentos de diferente tamaño con cada par de los 15 iniciadores y con la población completa de la progenie PCS1. El PCR estándar fue llevado a cabo usando 50 ng de ADN genómico y las mismas condiciones de PCR dadas por Bormann *et al.*, (2004), con la única diferencia en la concentración del iniciador con 0.25  $\mu\text{M}$  por cada uno. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador MJ Research PTC-200™. Las condiciones de reacción de PCR fueron: 93°C por 2 minutos, 30-40 ciclos (dependiendo del iniciador) de denaturación a 95°C por 45 s, apareamiento a la Ta como especifica en la **Tabla 3.3** por 45 s, extensión a 72°C por 90 s y una extensión final a 72°C por 10 minutos (**Apéndice 5**).

### 3.2.8.3 Electroforesis de los productos amplificados

Previamente a la electroforesis, alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de los productos de amplificación (30  $\mu\text{l}$ ) fueron mezclados con 5  $\mu\text{l}$  (50% del volumen final de reacción) del tampón de carga Dye. Luego, 6  $\mu\text{l}$  de la mezcla de los productos amplificados fueron cargadas en geles denaturantes de poliacrilamida 6%, corridos en cámaras verticales de electroforesis de secuenciación modelo S2 (Gibco BRL). La electroforesis se llevó a cabo hasta obtener las bandas en el tercio inferior del gel, para así obtener una mayor separación entre estas, teniendo en cuenta el rango del tamaño esperado de los fragmentos amplificados. Para detalles acerca de la preparación de los geles de poliacrilamida y preparación de soluciones véase **Apéndice 6 y 9**.

### 3.2.8.4 Detección del polimorfismo

Al término de la corrida electroforética, se utilizó la metodología de tinción argéntica o de nitrato de plata, para visualizar las bandas. Para más detalle de la metodología ver **Apéndice 7**.

### 3.2.8.5 Identificación de SSCP

Los productos de amplificación en los que no se detectó polimorfismo en geles de agarosa y poliacrilamida, fueron corridos en un gel no denaturante de poliacrilamida para detectar diferencias entre las cadenas simples del producto de PCR. El patrón de segregación de las bandas polimórficas fueron registrado en una matriz binaria para su posterior análisis. El protocolo de geles SSCP se detalla en el **Apéndice 8**.

### 3.2.9 Análisis de datos

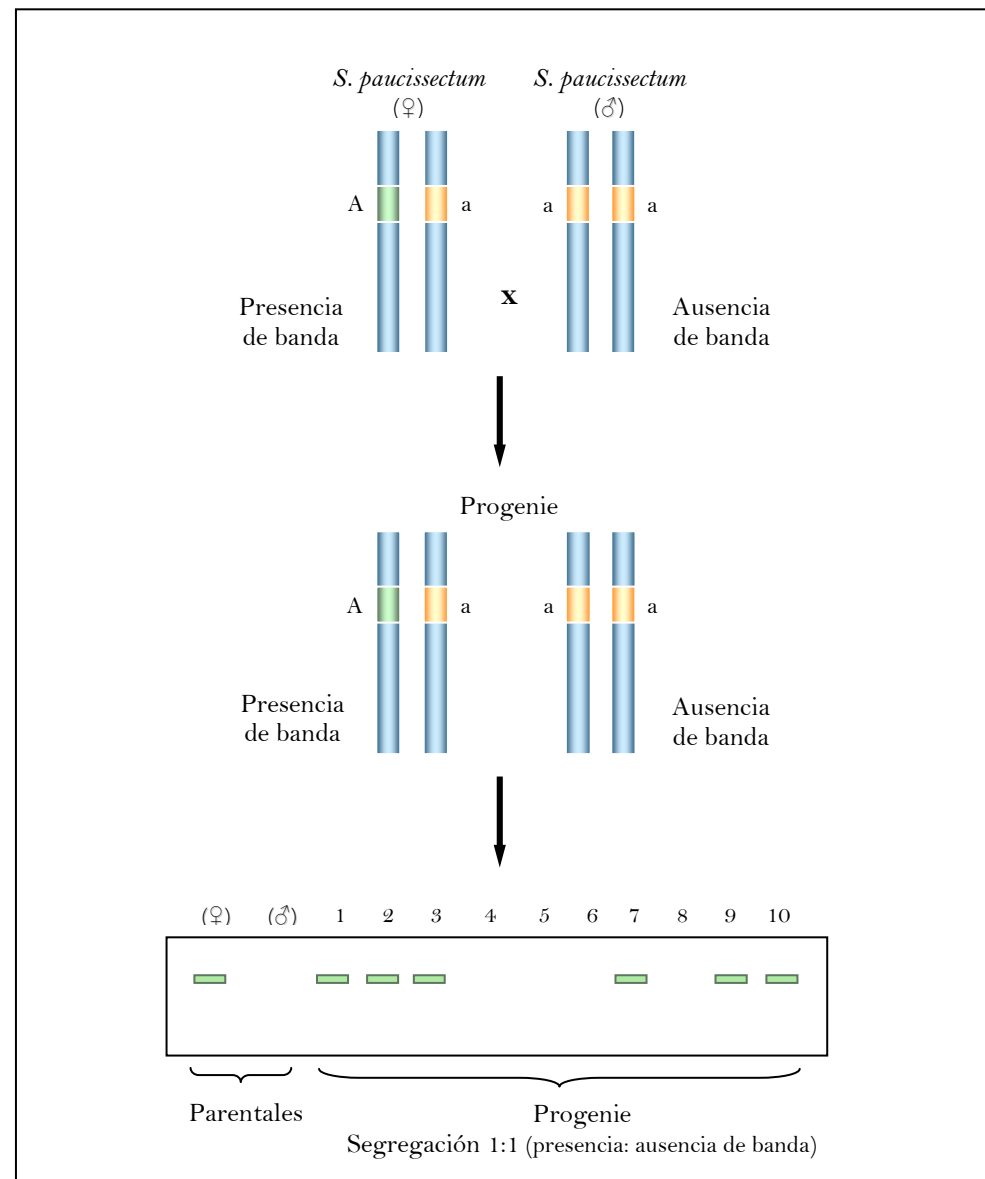
#### 3.2.9.1 Análisis de segregación

En la progenie PCS1 las bandas monomórficas fueron excluidas del análisis de datos debido a que no son informativas. Las bandas polimórficas obtenidas con el perfil NBS y loci candidatos son las que segregan en la progenie, y debido a su naturaleza dominante se espera un patrón de segregación 1:1 para los dos alelos de cada locus marcador. La explicación genética de este polimorfismo en los progenitores (presencia de la banda en un progenitor y ausencia en el otro) es la existencia de un locus A con dos alelos (A y a), uno de los cuales da un producto de amplificación por PCR (alelo A) mientras que el otro no da origen a ningún producto de amplificación (alelo a). Por lo tanto, el progenitor que muestra una banda es heterocigoto (Aa) y el otro es homocigoto para el alelo a (aa) (**Figura 3.7**).

La presencia o ausencia de los marcadores en los genotipos evaluados fueron leídos independientemente dos veces para asegurar su confiabilidad y eliminar posibles errores en la asignación de la presencia de un marcador a un genotipo. Los diferentes patrones generados se registraron mediante una matriz binaria en una hoja Microsoft Excel, en la cual la presencia de bandas polimórficas fueron valorada como 1 y la ausencia como 0. Los fragmentos que no pudieron ser estimados fiablemente fueron declarados como valores extraños 9. Los datos genotípicos como 1 y 0 fueron usados en el análisis de datos mediante la prueba estadística de Chi cuadrado ( $X^2$ ).

#### 3.2.9.2 Prueba de proporciones

Una prueba de proporciones permite probar si dos o más categorías guardan una relación de segregación esperada (Strickberger, 1976). Una hipótesis en el modo de herencia fue hecha en tales casos basada en la prueba Chi cuadrado ( $X^2$ ) para la desviación de las proporciones de segregación esperada 1:1 (presencia versus ausencia) de fragmentos parentales específicos y 3:1 (presencia versus ausencia) de fragmentos comunes. La hipótesis nula ( $H_o$ ) establece que existe segregación 1:1 de los marcadores, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) plantea que no existe segregación 1:1 de los marcadores. Este método de inferir el modo de herencia basado en las proporciones de segregación puede resultar en una falsa hipótesis cuando las proporciones de segregación son altamente desviadas.



**Figura 3.7.** Esquema que muestra el patrón de segregación de las bandas polimórficas entre *S. paucisectum* 762126.227 (♀) y *S. paucisectum* 762124.236 (♂) de fragmentos NBS.



A continuación, se escoge un nivel de significación ( $\alpha=0.05$ ) para poder determinar el valor crítico. Luego este valor será comparado con el estadístico de prueba ( $\chi^2$ ), considerando como dato esperado (e) el patrón de segregación del marcador seleccionado, y como dato observado (o) el patrón de segregación del marcador desarrollado, considerándose un grado de libertad para cada caso. Si el  $\chi^2$  es menor al valor crítico se comprueba que las proporciones esperadas y las observadas son iguales, pero si éste es mayor se rechaza el supuesto anterior.

$$\chi^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

---

# Resultados

## 4.1 Compatibilidad de la progenie PCS1 y *P. infestans*

Mediante la prueba de hojas sueltas, se logró evaluar la infección por parte del patógeno en el material, determinándose de esta manera el rango de esporulación de la lesión. Las lesiones fueron evaluadas 6 días después de realizada la inoculación. La “raza 0” (PE840066) es definida como una raza incapaz de infectar plantas que tienen cualquiera de los genes *R* conocidos, mientras que los otros aislamientos (POX 067, PCO 093 y PCO 002) son razas complejas con genes *Avr*.

En el ensayo con los cuatro aislamientos, toda la progenie PCS1 mostró una reacción de compatibilidad con el patógeno, donde una segregación de fenotipos susceptibles indicó la no presencia de genes *R*. La **Tabla 4.1** presenta el número de genotipos susceptibles y resistentes con los cuatro aislamientos. Toda la progenie comprendió individuos susceptibles con las tres razas complejas, y sólo nueve genotipos mostraron fenotipo resistente frente al aislamiento avirulento (PE840066). Con respecto al rango de esporulación, se observó una baja esporulación en la población PCS1 frente a un control establecido fuertemente susceptible (Yungay).

Sorprendentemente, el progenitor femenino 762126.227 caracterizado anteriormente como altamente resistente al tizón tardío también mostró una reacción de compatibilidad en la prueba y con los cuatro aislamientos. El progenitor femenino también fue compatible con la raza 0 pero su grado de esporulación fue menos severo que en la progenie PCS1 (**Figura 4.1**). Por consiguiente, no se dio la transmisión de genes *R* por parte del progenitor femenino a la progenie PCS1.

La tasa de crecimiento de la lesión fue más lenta para el aislamiento PE840066 en comparación con los otros tres aislamientos POX 067, PCO 093 y PCO 002, esto debido a que existe una mayor agresividad en los aislamientos de raza compleja. Para la prueba se utilizó como testigos Atzimba (control resistente) y Yungay (control susceptible). La tasa de crecimiento de la lesión y el rango de esporulación observada para los aislamientos de raza compleja se incrementó desde la primera lectura realizada al tercer día, a diferencia del aislamiento PE840066 la cual recién fue evidente, seis días después de inoculados los folíolos.

Tabla 4.1. Número de fenotipos observados con la prueba de hojas sueltas

	Pcs 762126.227 (♀)	Pcs 762124.236 (♂)	Progenie
PE840066	+	+	+ (9/57)
POX 067	+	+	+ (0/57)
PCO 093	+	+	+ (0/57)
PCO 002	+	+	+ (0/57)









	762126.227 (♀)	762124.236 (♂)
PE840066		
POX 067		
PCO 093		
PCO 002		

Figura 4.1. Compatibilidad de los parentales con los cuatro aislamientos (PE840066, POX 067, PCO 093, PCO 002) de *P. infestans* mediante la prueba de hojas sueltas.

#### 4.2 Perfil NBS de la progenie PCS1 “762126.227 x 762124.236”

El procedimiento fue optimizado con material de papa (*S. paucisectum*) de la progenie PCS1. Siete combinaciones de iniciador NBS/enzima fueron probadas en la progenie PCS1 de 57 genotipos tan bien como en los genotipos parentales 762126.227 (♀) y 762124.236 (♂): NBS2/*RsaI*, NBS3/*RsaI*, NBS5/*RsaI*, NBS5/*HaeIII*, NBS7/*RsaI*, NBS7/*HaeIII* y NBS9/*RsaI*. Todos los perfiles generados con las diferentes combinaciones produjeron patrones de bandas reproducibles. La enzima *RsaI* fue mayormente usada para digerir el ADN de las muestras. Esta enzima produce fragmentos de ADN de extremos romos con un promedio de longitud de 300-400 pb.

La mayoría de las bandas amplificadas fueron monomórficas (415 bandas) entre genotipos de la progenie PCS1. Un promedio de 60 bandas monomórficas por combinación fueron obtenidas. Las siete combinaciones de iniciador/enzima (**Tabla 4.2**) produjeron 445 bandas, 40 de las cuales fueron encontradas por ser polimórficas en sólo seis de las siete combinaciones y consideradas como marcadores dominantes. Los porcentajes de polimorfismo promedio detectados usando *RsaI* y *HaeIII* como enzimas de restricción fueron 11% y 8%, respectivamente (**Tabla 4.3**). El número promedio de polimorfismo por combinación de iniciador/ enzima fue igual a 5, con un rango de 3 (NBS7/*HaeIII*) a 13 (NBS5/*RsaI*) bandas polimórficas. Cabe resaltar que con la combinación NBS2/*RsaI* no se obtuvo ningún fragmento polimórfico razón por la cual se consideró sólo los fragmentos monomórficos visibles.

Cinco de estos fragmentos NBS polimórficos (12.5% del total) fueron estimados de baja calidad debido a que presentaban más de un 5% de datos perdidos y a que la presencia o ausencia del fragmento había sido determinada con cierto margen de error a consecuencia de una falta de nitidez en las imágenes de los films. Diecisiete marcadores (NBS3/*RsaI* R54, R56, NBS5/*RsaI* R13, R19, R20, R30, NBS7/*RsaI* R27, R55, NBS9/*RsaI* R18, R27, R30, R39, NBS5/*HaeIII* R23, R25, R30, R31, NBS7/*HaeIII* R22) mostraron sólo una banda del progenitor 762126.227 (♀), mientras que en el progenitor 762124.236 (♂) fueron diez marcadores (NBS3/*RsaI* R30, R38, NBS5/*RsaI* R26, R47, R58, NBS7/*RsaI* R47, R59, NBS9/*RsaI* R34, NBS5/*HaeIII* R26, R39) que mostraron una sola banda (**Tabla 4.4**). Estos marcadores expresaron una proporción de segregación 1:1. Los trece marcadores restantes (NBS3/*RsaI* R45, NBS5/*RsaI* R17, R25, R32, R41, R52, R60, NBS7/*RsaI* R60, NBS9/*RsaI* R41, R53, NBS5/*HaeIII* R17, NBS7/*HaeIII* R33, R45) mostraron una banda de ambos padres, con un patrón de segregación 3:1. Diez marcadores (NBS3/*RsaI* R56, NBS5/*RsaI* R32, R47,

NBS7/*RsaI* R59, R60, NBS9/*RsaI* R27, R34, R39, NBS5/*HaeIII* R23, R25) tuvieron una segregación desviada ( $P < 0.05$ ) en la progenie, comprobado por la prueba de Chi  $X^2$ . La **Figura 4.2** muestra tres geles con el perfil NBS con un número de 60-75 bandas. Para claridad de la discusión, los fragmentos derivados del perfil NBS son llamados marcadores NBS.

La reproducibilidad fue ilustrada por el hecho que patrones de bandas de geles duplicados fueron idénticos, mientras que la especificidad de los dos pasos de PCR es ilustrada por el hecho que patrones de perfiles idénticos fueron producidos por marcaje radioactivo de la reacción de PCR exponencial con cualquiera de los iniciadores selectivos NBS y su subsiguiente electroforesis. El grado de polimorfismo fue comparado entre perfiles con diferentes enzimas de restricción, donde el perfil NBS5/*RsaI* resultó ser el más informativo frente a las otras combinaciones de iniciador/enzima en un 32.5% del total de las bandas polimórficas registradas. En cambio el perfil NBS7/*HaeIII* resultó ser el menos informativo con sólo 7.5% de las bandas polimórficas (**Tabla 4.2**).

Para el análisis de segregación de los marcadores NBS encontrados, se consideró a los marcadores con los 57 genotipos, donde diecisiete y diez marcadores derivaron del progenitor femenino y masculino respectivamente. De los 40 marcadores NBS encontrados en la progenie PCS1 solamente 30 (75% del total) se ajustaron a alguno de los dos tipos de segregaciones esperadas, donde 19 (47.5%) se ajustaron al tipo de segregación esperada 1:1 y 11 (27.5%) al tipo de segregación esperada 3:1; mientras que 10 (25% del total) tuvieron segregación desviada. Según los resultados obtenidos, el Chi  $X^2$  para la segregación esperada 1:1 de estos marcadores, detectó que el 12.5% (NBS3R56, NBS9R27, R39, NBS5R23, R25) de marcadores NBS de la madre 762126.227 y el 7.5% (NBS5R47, NBS7R59, NBS9R34) de marcadores NBS del padre 762124.236 estaban desviados para  $P < 0.05$ . Los principales detalles del análisis de segregación y el modelo genético que mejor se ajustó los marcadores NBS son resumidos en la **Tabla 4.4**.

**Tabla 4.2.** Nivel de polimorfismo de las 7 combinaciones iniciador/enzima usadas para el análisis del perfil NBS y reconocidas en la progenie PCS1

Método	Combinación Iniciador/enzima	Nº de bandas polimórficas (%)	Nº de bandas monomórficas (%)	Nº de bandas amplificadas (%)
Perfil NBS (radioactivo)	NBS2/ <i>Rsa</i> I	0 (0%)	33 (8.1%)	33 (8.1%)
	NBS3/ <i>Rsa</i> I	5 (12.5%)	65 (16.0%)	70 (15.7%)
	NBS5/ <i>Rsa</i> I	13 (32.5%)	47 (11.6%)	60 (13.5%)
	NBS7/ <i>Rsa</i> I	5 (12.5%)	70 (17.3%)	75 (16.9%)
	NBS9/ <i>Rsa</i> I	7 (17.5%)	76 (18.8%)	83 (18.7%)
	NBS5/ <i>Hae</i> III	7 (17.5%)	49 (12.1%)	56 (12.6%)
	NBS7/ <i>Hae</i> III	3 (7.5%)	65 (16.0%)	68 (15.3%)
	Total de bandas	40 (100%)	405 (100%)	445 (100%)

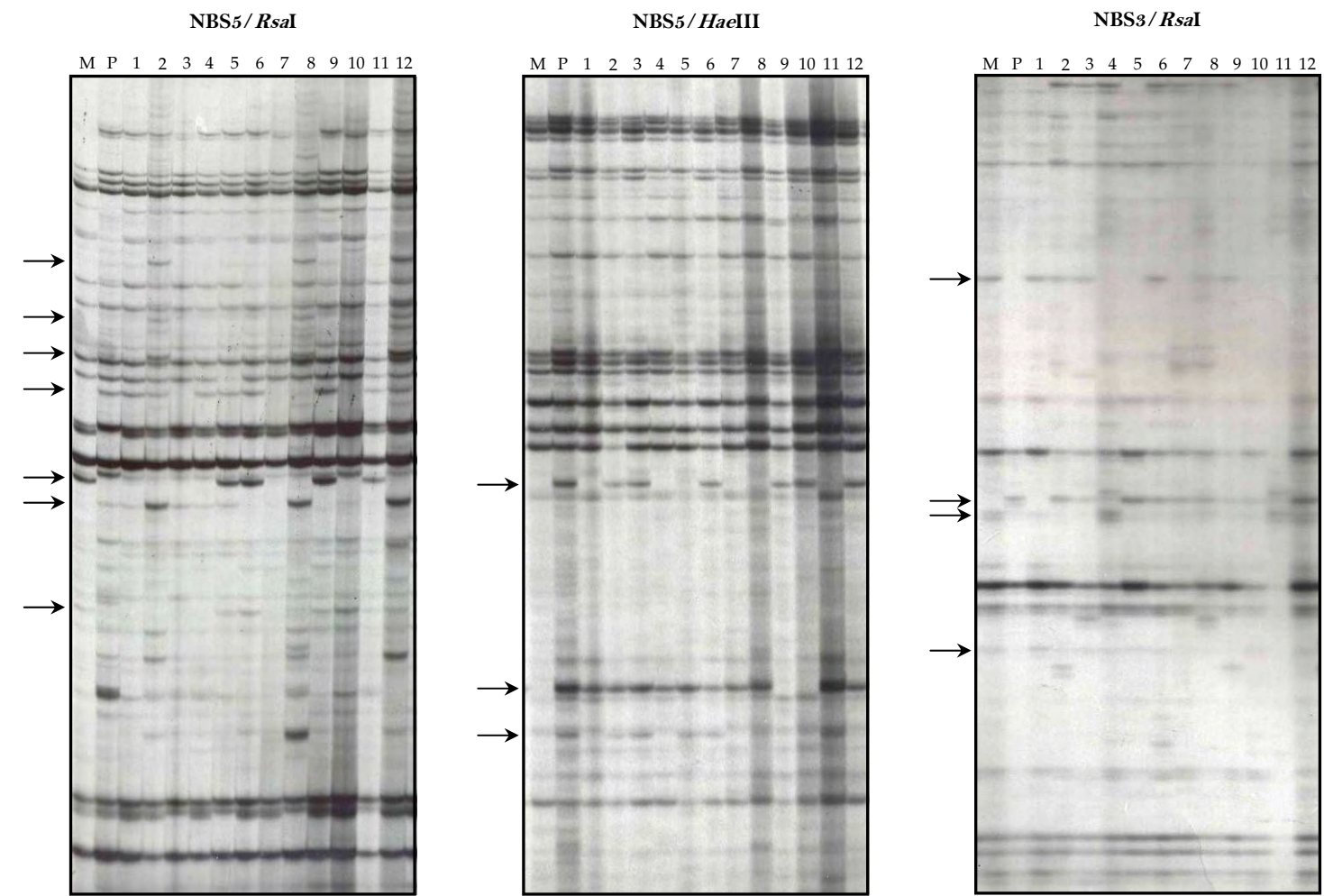
**Tabla 4.3.** Porcentaje de polimorfismo medio con ambas enzimas de restricción (*Rsa*I y *Hae*III) usadas en el perfil NBS.

Combinación Iniciador/enzima	Nº de bandas amplificadas (100%)	Nº de bandas polimórficas (%)	% de polimorfismo promedio/enzima
NBS2/ <i>Rsa</i> I	33	0 (0%)	11%
NBS3/ <i>Rsa</i> I	70	5 (7.1%)	
NBS5/ <i>Rsa</i> I	60	13 (21.7%)	
NBS7/ <i>Rsa</i> I	75	5 (6.7%)	
NBS9/ <i>Rsa</i> I	83	7 (8.4%)	
NBS5/ <i>Hae</i> III	56	7 (12.5%)	8%
NBS7/ <i>Hae</i> III	68	3 (4.4%)	

**Tabla 4.4.** Análisis de segregación, combinación iniciador NBS/enzima, modelo genético y origen del alelo marcador de los fragmentos NBS polimórficos

Combinación Iniciador/enzima	Fragmentos NBS polimórficos	Mejor modelo	Origen del alelo
NBS2/ <i>Rsa</i> I	-	- <sup>a</sup>	Ausente
	R30	1:1	236 <sup>b</sup>
	R38	1:1	236
NBS3/ <i>Rsa</i> I	R45	3:1	227, 236
	R54	1:1	227 <sup>c</sup>
	R56	1:1desviado	227
	R13	1:1	227
	R17	3:1	227, 236
	R19	1:1	227
	R20	1:1	227
	R25	3:1	227, 236
	R26	1:1	236
	R30	1:1	227
NBS5/ <i>Rsa</i> I	R32	3:1desviado	227,236
	R41	3:1	227, 236
	R47	1:1desviado	236
	R52	3:1	227, 236
	R58	1:1	236
	R60	3:1	227, 236
	R27	1:1	227
	R47	1:1	236
	R55	1:1	227
	R59	1:1desviado	236
NBS7/ <i>Rsa</i> I	R60	3:1desviado	227, 236
	R18	1:1	227
	R27	1:1desviado	227
	R30	1:1	227
	R34	1:1desviado	236
	R39	1:1desviado	227
	R41	3:1	227, 236
	R53	3:1	227, 236
	R17	3:1	227, 236
	R23	1:1desviado	227
NBS9/ <i>Rsa</i> I	R25	1:1desviado	227
	R26	1:1	236
	R30	1:1	227
	R31	1:1	227
	R39	1:1	236
	R22	1:1	227
	R33	3:1	227, 236
NBS5/ <i>Hae</i> III	R45	3:1	227, 236
NBS7/ <i>Hae</i> III			

<sup>a</sup> Ningún modelo genético aplicable.  
<sup>b</sup> Progenitor masculino 762124.236.  
<sup>c</sup> Progenitor femenino 762126.227.



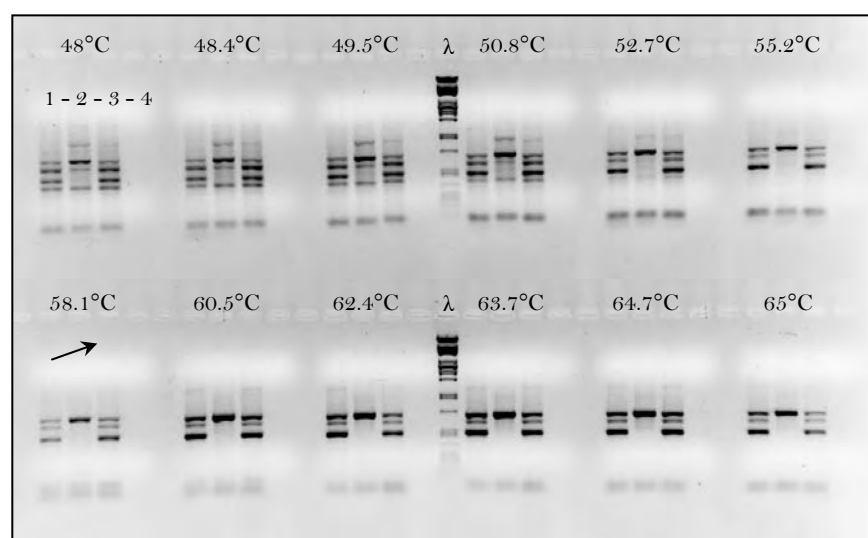
**Figura 4.2.** Ejemplo típico de polimorfismo revelado después de electroforesis por el perfil NBS para 12 individuos (1-12) pertenecientes a la progenie PCS1 junto con los progenitores (M, P). Las flechas indican las posiciones de algunas bandas polimórficas.



### 4.3 Caracterización de los iniciadores candidatos de la resistencia

#### 4.3.1 Optimización de iniciadores candidatos

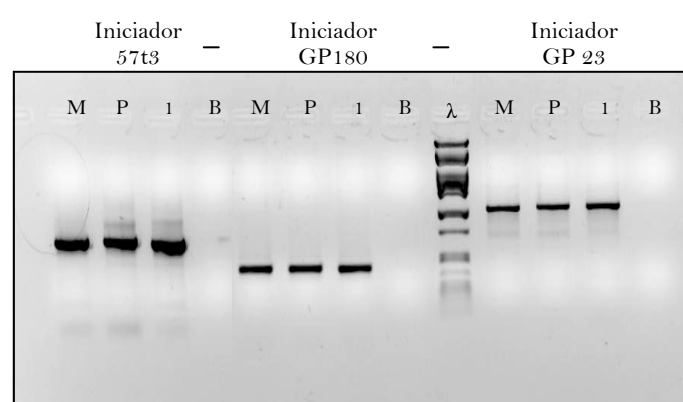
Se seleccionó las condiciones que permitieron la amplificación del mayor número de muestras posible y con mejor calidad. Así, la calidad de amplificación de los 15 pares de iniciadores fue probada en los progenitores 762126.227 (♀) y 762124.236 (♂), y en un genotipo proveniente del cruce. En primer lugar se obtuvo la optimización de las temperaturas de apareamiento ( $T_a$ ) de cada uno de los pares de iniciadores candidatos y luego se siguió con la optimización de su amplificación. La **Figura 4.3** muestra la elección en la  $T_a$  del iniciador *GP179* mediante gradiente de temperatura. En la **Tabla 3.3** se encuentra las óptimas  $T_a$  elegidas para cada uno de los iniciadores candidatos.



**Figura 4.3.** Optimización de las  $T_a$  de los iniciadores candidatos a la resistencia mediante gradientes de temperatura, en este caso se muestra el resultado con el iniciador *GP179*. La flecha indica la elección de la  $T_a$ .  $\lambda$ : ADN Lambda digerido con *Pst*I; 1: madre 227; 2: padre 236; 3: individuo de la población PCS 1; 4: blanco.

En la optimización de las condiciones de amplificación, los criterios considerados en la calidad de la amplificación fueron: intensidad de banda y ausencia de rastros difusos en el carril. Para tal finalidad, se utilizó un programa de PCR estándar con temperaturas de apareamiento distintas, propias para cada iniciador, en el rango de 50 a 65°C. Cuando los productos de PCR no mostraban una amplificación adecuada se modificaron las concentraciones de los reactivos del PCR, así como también se varió los parámetros de las condiciones de reacción en cada etapa de PCR. Las condiciones óptimas para producir

amplicones en los 59 genotipos utilizadas con los 15 pares de iniciadores fueron: Buffer 1X, Iniciador 0.5 M, dNTPs 0.25 mM, *Taq* Polimerasa 1 U y ADN 10 ng. La **Figura 4.4** muestra la confirmación de productos PCR específicos en la optimización de la amplificación de iniciadores candidatos en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 4.4.** Optimización de la amplificación de los iniciadores candidatos obtenidos con los iniciadores 57t3, GP180 y GP23. M: Progenitor femenino 762126.227. P: Progenitor masculino 762124.236. 1: genotipo de la progenie PCS1. B: Blanco.

#### 4.3.2 Análisis genotípico en la progenie PCS1 “762126.227 x 762124.236”

Las plantas de la progenie PCS1 fueron genotipadas con 15 marcadores de resistencia de posiciones conocidas en los grupos de ligamiento (GL) II, IV, V, VIII, XI y XII del mapa molecular de la papa (**Tabla 3.3**). Los marcadores fueron seleccionados sobre la base de que ellos anclaron tanto en QTLs para resistencia al tizón tardío en experimentos de mapeo independiente y/o en genes *R*. Sólo se consideró a los marcadores polimórficos, cuando al menos un alelo maternal o un alelo paternal para el loci marcador etiquetando el segmento fueron segregantes y registrados. Un mapa de papa esquemático con la localización cromosómica de todos los marcadores analizados es mostrado en la **Figura 2.5**. Los loci marcadores fueron analizados por PCR usando la información de las secuencias de los iniciadores específicos, resultando en fragmentos de ADN de buena calidad en la progenie PCS1 después de su optimización, y el tamaño del fragmento exacto pudo reconocerse sin mayor inconveniente.

Los PCRs con los 15 pares de iniciadores utilizados para encontrar polimorfismo entre los genotipos de la población PCS1 resultaron en claros amplicones. En tres (20%) de ellos (*BA47f2*, *CP60*, *CP113*) no se pudo lograr una amplificación clara del tamaño del producto deseado, y cuatro (26.7%) (*GP23*, *GP180*, *CosA*, *GP21*) resultaron siendo monomórficos, debido a la insuficiente separación de los fragmentos por lo que no fueron considerados en los genotipos analizados. Ocho de los iniciadores (53.3%) resultaron en amplicones polimórficos,

tres de los cuales (*GP179*, *NL25*, *NL27*) provienen de análisis directo en agarosa al 1% y cinco (*BA121o1t7*, *57t3*, *GP125*, *C2AT* y *LE-HB-T7*) después de análisis en geles SSCP (**Tabla 4.5**). Entonces, se logró un análisis en 3 de los 6 GL examinados para ambos padres.

Las **Figuras 4.5-4.8** muestran ejemplos de la segregación de los productos de PCR obtenidos con los ocho iniciadores específicos polimórficos en los progenitores y la progenie PCS1, las plantas fueron ordenadas de acuerdo a la rotulación hecha en el cruce respectivo. Es así que en los productos de PCR con el iniciador específico *GP179*, un polimorfismo fue observado directamente (**Figura 4.5**). El producto de 570 pb descendiendo del progenitor ♀ 762126.227 indicó la presencia del alelo de resistencia basada en los datos de pruebas de hojas separadas “detached leaf”. Cuando el ADN de la progenie PCS1 fue amplificado con el iniciador específico *GP125*, los fragmentos resultaron ser uniformes en tamaño. El alelo *GP125* ligado con la resistencia fue, sin embargo, detectado después de su corrida en un gel de poliacrilamida (**Figura 4.8**).

La segregación de alelos marcadores fue demostrada por encontrar que se ajusta a uno de los dos modelos genéticos con la prueba de Chi  $X^2$ . Un umbral de  $P > 0.05$  fue aceptado para los marcadores estudiados, debido al tamaño de la progenie analizada. Cuando el alelo marcador estaba presente en un padre, el promedio de segregación observada fue estimada por encontrar el modelo 1:1 (presencia y ausencia). Cuando el alelo marcador estaba presente en ambos padres, el modelo 3:1 fue estimado. Los resultados muestran que 6 alelos (*GP179*, *BA121o1t7*, *GP125*, *NL25*, *NL27*, *LE-HB-t7*) segregan del progenitor ♀ 762126.227 (R) y 2 alelos (*57t3*, *C2AT*) del progenitor ♂ 762124.236 (S) en la progenie PCS1. Las principales características de los alelos marcadores polimórficos son mostradas en la **Tabla 4.6**.

De estos ocho alelos marcadores, cinco (el 63% del total) se ajustan al modelo genético de segregación esperada 1:1; mientras que, los tres restantes (37% del total) fueron de segregación desviada. La proporción esperada 1:1 para la segregación de los alelos marcadores de la resistencia a tizón tardío presentes en el progenitor ♀ 762126.227 en el estado heterocigoto fue encontrada en la amplificación de los fragmentos con los iniciadores específicos *BA121o1t7*, *NL25*, y *LE-HB-T7* (**Tabla 4.6**). Asimismo en esta progenie, hubo segregación desviada en algunos alelos marcadores, con un exceso de genotipos susceptibles (P) o ausencia (A) del alelo marcador con el iniciador *GP179* (18 P contra 39 A,  $X^2_{1:1}=7.74$ ,  $P < 0.05$ ), y con un exceso de los alelos marcadores *NL27* (37 P contra 20 A,  $X^2_{1:1}=5.08$ ,  $P < 0.05$ ) y *GP125* (38 P contra 19 A,  $X^2_{1:1}=6.34$ ,  $P < 0.05$ ). La **Tabla 4.7** muestra los porcentajes del modo de herencia encontrado en la progenie PCS1.

**Tabla 4.5.** Resultados y frecuencias de los productos de PCR con ambas metodologías (Agarosa al 1% y geles SSCP)

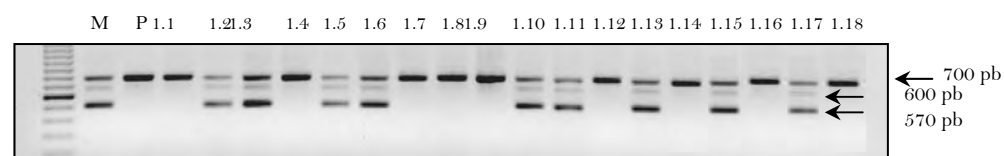
	Agarosa 1 %	Geles SSCP	Total
Iniciadores candidatos de la resistencia	9	6	15
Iniciadores que no amplificaron o amplificación no discernible (porcentaje de estos iniciadores)	3 (33.3 %)	0 (0 %)	3 (20 %)
Productos PCR monomórficos (porcentaje de estos iniciadores)	3 (33.3 %)	1 (16.7 %)	4 (26.7 %)
Productos PCR polimórficos (porcentaje de estos iniciadores)	3 (33.3 %)	5 (83.3 %)	8 (53.3 %)

**Tabla 4.6.** Segregación observada, modelo genético y origen del alelo marcador

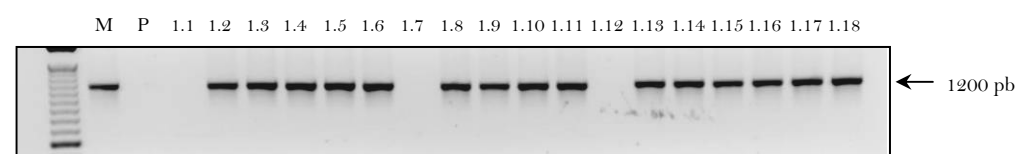
762126.227 x 762124.236					
Promedio de segregación del alelo					
GL	Marcador	Presente	Ausente	Modelo Genético	Origen del alelo
V	GP179	18	39	1:1desviado	Pcs762126.227 (♀)
	BA121o1t7	28	28	1:1	Pcs762126.227 (♀)
VIII	57t3	30	27	1:1	Pcs762124.236 (♂)
XI	GP125	38	19	1:1desviado	Pcs762126.227 (♀)
	NL25	25	32	1:1	Pcs762126.227 (♀)
	NL27	37	20	1:1desviado	Pcs762126.227 (♀)
	C2AT	24	30	1:1	Pcs762124.236 (♂)
	LE-HB-t7	25	32	1:1	Pcs762124.236 (♂)

**Tabla 4.7.** Análisis del modo de herencia en la población PCS1 usando la prueba  $X^2$  para la desviación de la segregación esperada 1:1 (presencia:ausencia) de los fragmentos amplificados

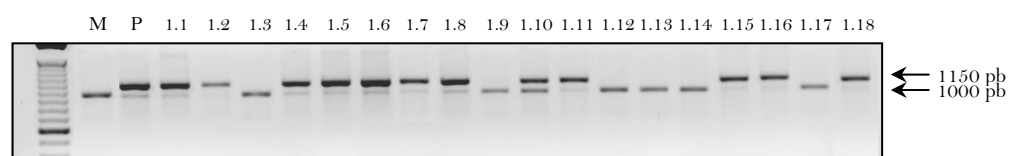
Progenitor	No desviados P>0.05	Desviados P>0.05	Nª total de fragmentos
762126.227 (♀)	3 (50.0 %)	3 (50.0 %)	6 (100 %)
762124.236 (♂)	2 (100 %)	0 (0.0 %)	2 (100 %)
Total	5 (63.0 %)	3 (37.0 %)	8 (100 %)



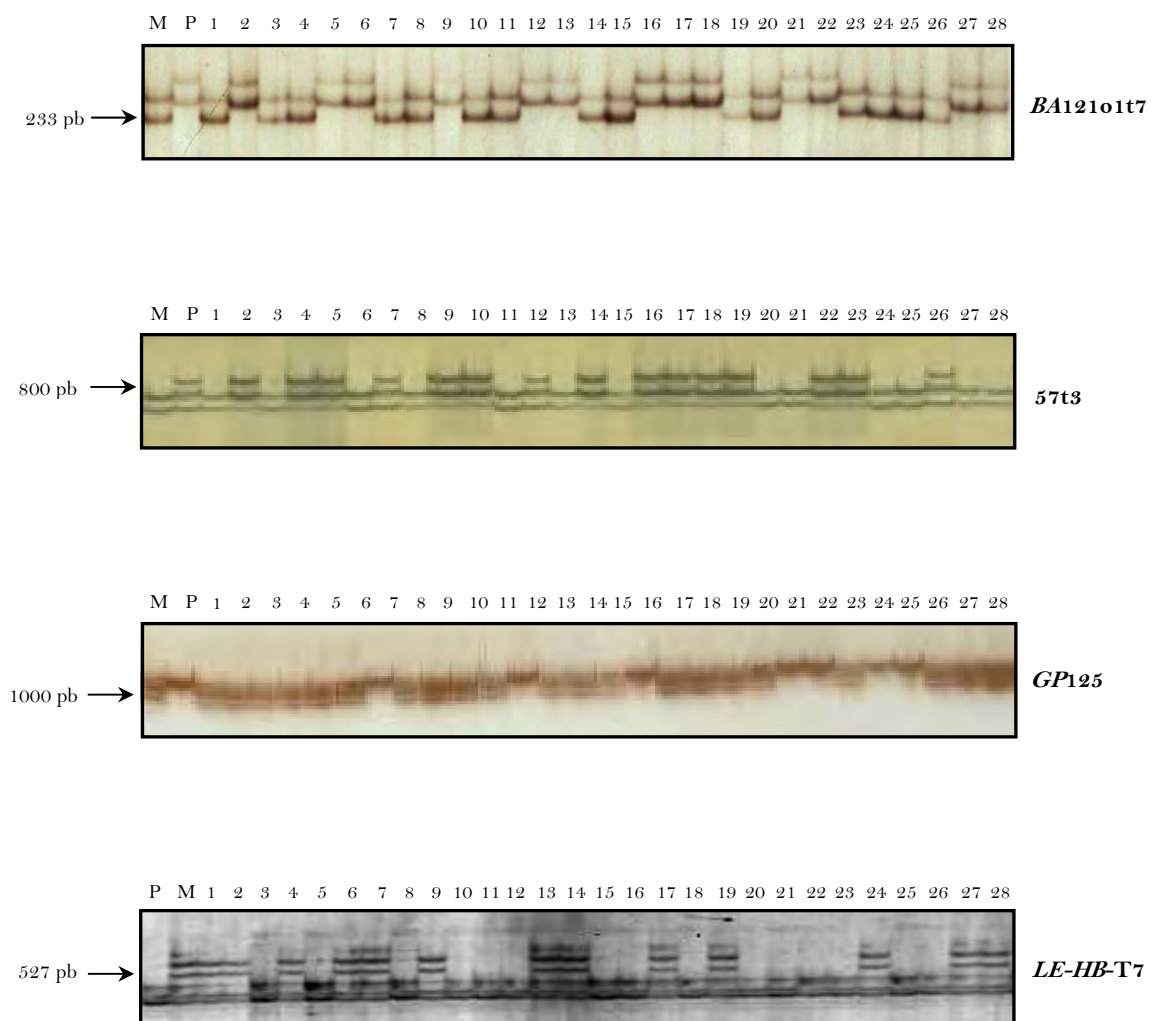
**Figura 4.5.** Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico *GP179* en algunos individuos de la población PCS1 de *S. paucissectum* en gel de agarosa al 1%. Carril M: Progenitor femenino 762126.227, carril P: Progenitor masculino 762124.236, carril 1.1-1.18: genotipos de la progenie PCS1. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.



**Figura 4.6.** Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico *NL27* en algunos individuos de la población PCS1 de *S. paucissectum* en gel de agarosa al 1%. Carril M: Progenitor femenino 762126.227, carril P: Progenitor masculino 762124.236, carril 1.1-1.18: genotipos de la progenie PCS1. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.



**Figura 4.7.** Productos de PCR obtenidos con el iniciador específico *NL25* en algunos individuos de la población PCS1 de *S. paucissectum* en gel de agarosa al 1%. Carril M: Progenitor femenino 762126.227, carril P: Progenitor masculino 762124.236, carril 1.1-1.18: genotipos de la progenie PCS1. El tamaño de los fragmentos se indica a la derecha.



**Figura 4.8.** Productos de PCR obtenidos con los iniciadores específicos *BA12101t7*, *57t3*, *GP125*, *LE-HB-T7* en algunos individuos de la progenie PCS1 de *S. paucissectum*. Carril M: Progenitor femenino 762126.227, carril P: Progenitor masculino 762124.236, carril 1-28: individuos de la población PCS1. El tamaño de los fragmentos se indica a la izquierda. El polimorfismo de los fragmentos fue obtenido en geles SSCP.

---

## Discusión

### 5.1. Evaluación de la infección con *Phytophthora infestans*

La progenie PCS1 fue evaluada fenotípicamente para resistencia a tizón tardío con la prueba de hojas sueltas y razas específicas de *P. infestans*. La extrema resistencia observada en el progenitor ♀ 762126.227 no fue transmitida en la progenie como un factor genético dominante simple (**Figura 4.1**). La segregación de individuos susceptibles en toda la progenie PCS1 indicó la no expresión de uno o más genes *R* que se supone vendrían del progenitor femenino. Sin embargo, en nueve de los 57 genotipos probados con el aislamiento avirulento, la segregación observada no pudo ser explicada asumiendo que existe la herencia mendeliana de sólo genes *R* dominantes. El proporción 1:3 de la progenie PCS1 con el aislamiento avirulento (**Tabla 4.1**) podría resultar de la acción de un simple gen *R* recesivo. Esto es, sin embargo, no frecuente porque todos los genes *R* probados hasta ahora han sido demostrados por ser heredados dominantemente (Malcolmson y Black, 1966). Una posible explicación es la presencia y segregación independiente de un gen supresor dominante para estos genes *R* específicos, reportado anteriormente en otras poblaciones segregantes (El-Kharbotly *et al.*, 1996; Ordóñez *et al.*, 1997). Cuando el gene *R* y su supresor vienen de padres diferentes una segregación en 1 fenotipo resistente a 3 susceptibles R: S, sería esperado.

Por otro lado, Colque (1996) menciona que los discos de hojas exhiben reacciones variantes, lo cual sugiere que un leve cambio en el estado fisiológico de la hoja suelta puede afectar el establecimiento de la lesión. Vleeshowers *et al.* (1999) sugiere que hojas separadas cubiertas con alta humedad como fue el caso en el experimento realizado en cámaras frías, son más susceptibles que las hojas en plantas intactas; esto pudo haber ocurrido en nuestro ensayo debido a que no se observó una repuesta de hipersensibilidad claramente. Asimismo, menciona que no se puede predecir si la interacción de una raza 0 con plantas que tienen genes *R* desconocidos será compatible o incompatible, por lo tanto la reacción de compatibilidad presentada por *S. paucisectum* no debería interpretarse como ausencia de genes *R*.

En experimentos realizados con *S. tuberosum*, Colon *et al.* (1995), encontraron que la capacidad de esporulación era el componente que más variaba entre los genotipos susceptibles y esto estaba positivamente asociado con la eficiencia de infección. En el caso de la progenie PCS1, se podría considerar que el bajo nivel de esporulación es causado por la ineficiente infección del patógeno y que a su vez es debida a la presencia de genes *R* no conocidos.

La expresión de resistencia cuantitativa y cualitativa a *P. infestans* puede ser difícil de evaluar, desde que factores ambientales, de desarrollo, estado fisiológico de la planta, y la concentración del inóculo pueden influenciar el fenotipo observado (Wastie, 1991; Turkensteen, 1993; Collins *et al.*, 1999). Ensayos de resistencia a la enfermedad conducidos en invernaderos con la prueba de hojas sueltas o plantas enteras, permiten evaluaciones rápidas, controladas ambientalmente por muchos genotipos y aislamientos de patógenos. Sin embargo, el valor de estas pruebas depende directamente en su habilidad para reflejar adecuadamente la resistencia de la planta a *P. infestans* bajo condiciones de campo.

### 5.1 Evaluación de la técnica del perfil NBS

En nuestro estudio, el poder del perfil NBS fue ilustrado por el diverso grupo de fragmentos NBS presentes como marcadores polimórficos en los siete perfiles con diferentes iniciadores y enzimas en papa. Dependiendo del motivo y del iniciador, en promedio pudieron ser amplificadas de 55-60 bandas por combinación después de las dos reacciones de PCR; datos que concuerdan con otros trabajos reportados en papa (van der Linden *et al.*, 2004; Brugmans, 2005; Malosetti, 2006). Esto se explica en el porcentaje del genoma probado, en el número promedio de productos observados por muestra, así como también en el número total de combinaciones probadas, y en el hecho que sólo una de las dos cadenas de ADN es detectada por marcaje del iniciador por fragmento.

La técnica NBS a pesar de contar con un bajo porcentaje de polimorfismo (8.98%), contribuyó con 40 marcadores polimórficos observados en la progenie PCS1, a través de seis de las siete combinaciones probadas. Estos resultados por una parte son comparables al 10.33% y 13.47% previamente encontrados en genotipos de otras especies de plantas pero no en poblaciones segregantes por van der Linden *et al.* (2004) y Mantovani *et al.* (2006) respectivamente, con el uso de las mismas y otras combinaciones iniciador/enzima. Por otra parte, el porcentaje de polimorfismo contrasta con lo reportado por Brugmans (2005) y Calenge *et al.* (2005) en 17.87% y 23.11%, al trabajar con poblaciones segregantes, en donde al igual que los primeros, los fragmentos generados mostraron homología de secuencias con genes *R* o RGAs. Debe tenerse en cuenta que la proporción varía de acuerdo a la combinación de especies, iniciador y enzimas usadas.

Al analizar cada perfil NBS por separado, se observó que el perfil más informativo fue NBS5/*RsaI* en el que el 32.5% de bandas registradas derivó en fragmentos polimórficos, lo cual está de acuerdo con lo hallado por van der Linden *et al.* (2004), quien encontró que el 25%



de los fragmentos amplificados para ese mismo perfil NBS, era también el más informativo. El motivo kinasa-2 que forma parte del iniciador degenerado usado en el perfil, es conocido por ser altamente conservado a través de diferentes especies de plantas (Meyers *et al.*, 1999). Esto es ejemplificado por el hecho que, aun cuando los iniciadores fueron diseñados de genes *R* y RGAs aislados de especies no pertenecientes a la familia Solanaceae y las condiciones de PCR fueron muy específicas, un perfil de bandas pudo ser obtenido en papa.

Si bien es cierto, existen trabajos precedentes que reportan la identificación de RGAs en varias especies de plantas, en los cuales para verificar el origen de los fragmentos polimórficos, estos son secuenciados para determinar una significativa similitud con secuencias específicas de genes *R* conocidos o RGAs a fin de confirmar así que la mayoría de los fragmentos NBS amplificados son de naturaleza RGA. No obstante, sus resultados son difíciles de comparar con los nuestros, ya que en este trabajo no se llegó a secuenciar las bandas polimórficas; sin embargo, la no verificación de semejanza con alguna secuencia peptídica, no hace indicar necesariamente que estas secuencias no son RGAs. Debido a que la especificidad del perfil NBS depende en un simple iniciador específico que está diseñado en las bases de un alineamiento de secuencias de genes *R* conocidos, es concebible que la selectividad del iniciador esté predispuesto hacia los RGAs.

Entre las consideraciones metodológicas, hay varios factores que contribuyen al éxito de la técnica del perfil NBS. La condición más importante radica en los iniciadores que necesitan ser selectivos para genes *R* y RGAs, y al mismo tiempo por reconocer diferentes genes. Se considera que el éxito de un iniciador depende del número de sus degeneraciones, la longitud, composición nucleotídica, y la posición de las degeneraciones dentro del iniciador, tan bien el número de sitios putativos del ADN genómico en estudio, ya que ninguna recomendación general puede ser hecha si no se tiene en cuenta dicha condición especial (van der Linden *et al.*, 2004).

Otros pasos en el protocolo también contribuyen a la especificidad y confiabilidad de la técnica. Por ejemplo, para la digestión se empleó varias concentraciones de ADN desde 200, 250, 300, 350 y 400 ng/μl; ya que de esta forma se aseguró establecer una correcta digestión, la variación en la cantidad de ADN no resultó en diferentes patrones. Sin embargo, se eligió trabajar con 250 ng/μl por ser una cantidad promedio y coincidir con lo reportado por van der Linden *et al.* (2004). El uso de un adaptador simple (adapter mix) con un extremo 3' bloqueado en la cadena corta por la presencia de un grupo amino, evita la elongación por la *taq* polimerasa lo que fue esencial para prevenir la amplificación de fragmentos adaptador/adaptador. Además,

se determinó que al utilizar 2.5 unidades de enzima ADN ligasa era permisible ligar los fragmentos de ADN digeridos con el adaptador, en contraste de lo reportado por van der Linden *et al.* (2004), quienes usaron 5 unidades. Igualmente, el uso de una HotStar *Taq* ADN polimerasa fue esencial para obtener patrones de bandas de alta calidad (van der Linden, 2004), debido a que la enzima es suministrada en un estado inactivo que exhibe actividad no polimerasa; esto previene la formación de dímeros que se originan a temperaturas bajas durante la preparación de la reacción (master mix) y el periodo inicial de calentamiento lo que asegura una amplificación altamente específica en combinación con el iniciador NBS.

Los iniciadores destinados en el mismo motivo pero a posiciones ligeramente diferentes y con composiciones nucleotídicas un poco disímiles pueden producir patrones de bandas completamente diferentes, lo que indica que la variación genética detectada por el perfil NBS puede estar incrementada por la secuencia del iniciador adaptador por reconocer marcadores NBS que estén relacionados con nuevos RGAs. El extremo 3' del iniciador NBS5 que reconoce el dominio Kinasa-2 de la región NBS, esta basado en la secuencia altamente conservada de aminoácidos DD(I/V)W. La conservación del triptófano en esta posición esta fuertemente ligado a la clase de genes *R* no-TIR (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000). Para reconocer la familia de genes *R* que contienen TIR se requiere un iniciador que ancle también en el dominio Kinasa-2, pero con un extremo 3' unido a la secuencia conservada DD(I/V)D de esta clase de genes *R*. En el genoma de *Arabidopsis*, el 30% de 200 genes *R* putativos que contienen NBS-LRR son de la clase no-TIR (TAGI, 2000).

Otra posibilidad de expandir el grupo de marcadores RGA sería muestrear la variación genética en el LRR de los genes NBS-LRR ya que mutaciones en el LRR son una fuente de variación genética por tener un efecto largo en especificidades patogénicas (Michelmore y Meyers, 1998). Esto podría ser posible por reconocer motivos en posiciones posteriores al dominio kinasa-2, por ejemplo, el motivo GLPL. Alternativamente, el iniciador NBS5 podría ser usado en un perfil NBS con enzimas de restricción de corte menos frecuente, a fin de generar fragmentos más largos que choquen en la región LRR. La metodología NBS utiliza dos amplificaciones con el objetivo de eliminar los fragmentos no específicos que aparecen debido a apareamientos desiguales en la amplificación asimétrica y para tener una cantidad considerable de molde en las siguientes reacciones.

Por otro lado, existen muchos trabajos que reportan el uso de regiones conservadas en genes *R* y RGAs para evaluar la diversidad de loci de resistencia a la enfermedad. Chen *et al.* (1998) usaron el PCR con pares de iniciadores degenerados para amplificar parte del NBS de

un número de RGAs como fue reportado por Leister *et al.* (1996), Kanazin *et al.* (1996), Yu *et al.* (1996), Aarts *et al.* (1998), y Speulman *et al.* (1998), y la longitud de los polimorfismos de los productos de PCR fueron detectados con electroforesis de alta resolución. El perfil NBS difiere de este enfoque por usar un iniciador degenerado NBS en combinación con un adaptador ligado a un sitio de restricción. Esto permite la detección de polimorfismos de longitud también como polimorfismos dentro del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. La posibilidad para examinar RGAs y genes *R* con un número de enzimas de restricción incrementa las oportunidades de encontrar variación genética que este cercanamente ligado al carácter de resistencia de interés.

Asimismo, el enfoque usado para el perfil NBS tiene similitudes a la propuesta del AFLP modificado de Hayes *et al.* (2000), donde los pasos de digestión del ADN, ligación del adaptador, y la pre-amplificación son de acuerdo al protocolo de AFLP; como consecuencia, la reacción de PCR con el iniciador *EcoR*1 marcado y un iniciador NBS específico marcado radioactivamente genera el patrón de bandas de los fragmentos PCR. Sin embargo, la frecuencia de fragmentos NBS en patrones de bandas basada en la técnica de AFLP modificado con iniciadores selectivos NBS degenerados fue como máximo 20-25% (Hayes *et al.*, 2000). En contraste, el perfil NBS de papa con el iniciador NBS5 contuvieron 88% de fragmentos secuenciados que pudieron ser positivamente identificados como RGAs con presencia de NBS (van der Linden *et al.*, 2004).

Recientes estudios han demostrado que en la búsqueda de marcadores ligados a genes de resistencia, el ADN y ARN pueden ser usados en combinación con el perfil NBS, con lo que se obtiene varios fragmentos derivados de RGA (Brugmans, 2005). En ambos, ADN y ARN, los fragmentos pueden ser generados y mostrar segregación entre los individuos. Pero para detección y clonamiento de genes *R* específicos, el ADNc (ADN complementario) en comparación con el ADNg (ADN genómico) es más adecuado debido a que el ADNc sólo contiene genes funcionales; además de amplificar fragmentos derivados de genes *R* al utilizar el perfil NBS. El ADNg como templado es más fácil para manejar y el porcentaje promedio de fragmentos polimórficos encontrados es mucho más alto que con ADNc. Pero sin considerar la elección del templado, el perfil NBS es una buena opción para la generación de marcadores polimórficos ligados a RGAs.

El perfil NBS además de ser una importante herramienta en estrategias de mejoramiento en cultivos (Calenge *et al.*, 2005; Brugmans, 2005), caracterización del germoplasma (van der Linden *et al.*, 2004), y estudios de biodiversidad (Mantovani *et al.*,

2006), puede ser una entrada para marcadores confiables de resistencia a la enfermedad, ya que constituye una técnica accesible, útil y confiable en la búsqueda de polimorfismo. Si se elige las secuencias de iniciadores cuidadosamente, es posible reconocer grupos (clusters) de genes *R*, lo que permite incluso, una búsqueda más enfocada de marcadores ligados cercanamente a un locus de resistencia a la enfermedad. La técnica puede fácilmente ser extendida a familia de genes donde amplifique en genomas con suficiente conservación para permitir la unión selectiva de un iniciador degenerado. Estos “blancos” pueden incluir familias de genes en plantas tan bien como otros organismos, incluso en humanos, tales como proteínas kinasas, genes citocromo P450, y genes MADS-box, tan bien como otros motivos de ADN conservados como elementos promotores envueltos en la regulación de la transcripción de genes (van der Linden *et al.*, 2004).

## 5.2 Evaluación y análisis genético de los iniciadores candidatos

La optimización de las condiciones de amplificación de los iniciadores candidatos es usual puesto que no todos los protocolos de PCR se pueden transferir directamente entre especies (Gebhardt *et al.*, 2006). Otros investigadores (Malosetti, 2006; Solomon-Blackburn *et al.*, 2007) reportan también la necesidad de adecuar un sistema de marcadores antes de poder utilizarlo fuera de la especie originaria. Es de esperar que la utilidad de un sistema de marcadores disminuya al aumentar la distancia filogenética de la especie en estudio con la especie en la que se identificó originalmente los marcadores (Oberhagemann *et al.*, 1999). Fuera de su especie originaria, un locus puede ser monomórfico o puede no amplificar. Collins *et al.*, 1999, reportan que existen especies a las que es intrínsecamente difícil transferir este tipo de marcadores. Nuestra experiencia coincide con esta hipótesis, pues durante las diferentes etapas del estudio se observó que existen diferencias entre especies y loci en su capacidad de producir bandas fácilmente detectables.

El análisis de segregación de los alelos marcadores polimórficos en la progenie PCS1 originada del cruce de progenitores diploides resistente con susceptible reveló que, en la mayoría de los casos (63%), la proporción esperada 1:1 para segregación del alelo dominante en condición heterocigota fue normal; mientras que, el 37% restante de los alelos marcadores, una proporción de segregación 1:1 desviada fue encontrada. Las proporciones de segregación desviada son usualmente observadas en papa (Gebhardt *et al.*, 1991; van Eck *et al.*, 1995; El-Kharbotly *et al.*, 1994) y podría resultar del ligamiento con factores letales balanceados (Bianchi *et al.*, 1962). Los marcadores diseñados para detectar combinaciones de alelos QTL específicos pueden asistir a la selección y evaluación eficiente de varios nuevos genotipos.

De los 15 marcadores polimórficos, sólo dos loci fueron significativamente ligados a QTL para resistencia a *P. infestans*: el locus *BA121o1t7* y el locus *NL25* localizados en los cromosomas V y XI, respectivamente (**Tabla 4.6**). El QRL (locus de resistencia cuantitativa) *Pin5A* para resistencia a *P. infestans* en el cromosoma V ha sido detectado en estudios de poblaciones de papa F1 diploide (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Visker *et al.*, 2003), en papa tetraploide (Bormann *et al.*, 2004) y también en un estudio de asociación (Gebhardt *et al.*, 2004). Esta región genómica es un “sitio caliente” de resistencia que contiene genes para resistencia a nemátodos, virus y el oomiceto *P. infestans* (Gebhardt y Valkonen, 2001). El mapa de genes de planta clonados en defensa patogénica cerca de QRL es alentador a la hipótesis que las variantes alélicas de genes mayores de resistencia también contribuyen a la resistencia cuantitativa (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Oberhagemann *et al.*, 1999; Gebhardt y Valkonen, 2001; Ballvora *et al.*, 2002; Bormann *et al.*, 2004). El marcador *NL25* (Bormann *et al.*, 2004) ha sido identificado en una región del cromosoma XI del genoma de la papa que contiene varios genes para resistencia cualitativa y cuantitativa a diferentes patógenos. El mayor QTL, *PLRV.1*, a sido mapeado también en ésta región cromosómica controlando la resistencia al PLRV (Marczewski *et al.*, 2001). Además, el *QTLpcs11* que confiere resistencia a *P. infestans* en *S. paucissectum* ha sido mapeado en el mismo segmento cromosómico (Villamon *et al.*, 2005).

Una proporción de segregación desviada fue observada para los loci marcadores *GP125* y *NL27* en la población diploide PCS1 (**Tabla 4.6**), ambos ligados al mayor QTL para resistencia a tizón tardío en el cromosoma XI. La clase genotípica de ambos marcadores Aa ligado a alelos favorables para la resistencia, significaron 2/3 en ambos casos en vez de 1/2 de la progenie. Otras poblaciones han sido analizadas usando estos marcadores y una segregación desviada para estos loci fue también observada (Bormann *et al.*, 2004). La más trivial explicación que para esto resulta es que la secuencia de los iniciadores no es demasiado sensitiva para diferenciar y cuantificar la presencia de todos los alelos segregados de los padres en la población correspondiente. Asimismo, una distorsión en la segregación fue observada para el locus marcador *GP179* (**Tabla 4.6**) ligado al locus *R1* y a varios QTL de resistencia en el cromosoma V (Oberhagemann *et al.*, 1999; Ballvora *et al.*, 2002; Bormann *et al.*, 2004). La clase genotípica del marcador Aa ligado a alelos favorables para la resistencia, representó 1/3 de la progenie en vez de 1/2. Este resultado es consistente con las observaciones que la segregación transgresiva hacia la susceptibilidad es frecuente en progenies de papa que segregan para resistencia a tizón tardío y que los niveles de resistencia absoluta decrecen durante los procesos de backcrossing en progenitores susceptibles (Ross, 1986).

Aunque es bien conocido que existe una asociación entre la resistencia de campo a tizón tardío y la maduración del follaje en los cultivos de papa, aun no se sabe si ambos caracteres están controlados por el mismo gen o un grupo de genes relacionados. Van Eck (1996), extendió una hipótesis donde resalta la proximidad del QTL para resistencia al tizón tardío y maduración, sugiriendo que el efecto en la resistencia era una consecuencia del tipo de maduración. Tres observaciones documentadas pueden dar apoyo a esta hipótesis. La primera es la concentración del inóculo, que en pruebas de resistencia, afecta los niveles y porcentaje de plantas de papa que resultan infectadas (Lapwood, 1977). La segunda es la conocida influencia de la edad de la planta en el nivel de resistencia a *P. infestans*. Las hojas más viejas son más susceptibles que las jóvenes. La tercera es que las papas pasan a través de fases de susceptibilidad incrementada al tizón tardío, uno cuando las plantas son muy jóvenes (no se expresa plenamente la resistencia) y otro cerca del tiempo de florecimiento (madurez fisiológica), separado por un periodo de resistencia incrementada en la planta adulta temprana (Campbell y Madden, 1990; Agrios, 1997). Si se asume que estas observaciones son verdaderas, el grado de resistencia a *P. infestans* puede cambiar cuando las plantas maduran y pudo ser el caso presentado en este trabajo.

La modificación o incluso supresión del fenotipo de resistencia es observada en la progenie, dependiendo de con qué padre susceptible es cruzado el origen de resistencia (Ross, 1986; El-Kharbotly *et al.*, 1996). En progenies que segregan para resistencia cuantitativa, los niveles de resistencia más altos o más bajos que aquellos presentes en los progenitores pueden ser expresados (Ross, 1986; Leonards-Schippers *et al.*, 1992). Otra explicación son las interacciones epistáticas entre QTL de resistencia, como es un caso encontrado para resistencia de *Capsicum annum* "pimienta" a *Phytophthora capsici* donde se detectó dos QTLs de efecto aditivo y al menos 4 QTLs epistáticos provenientes del progenitor susceptible que eran favorables para la resistencia (Lefebvre *et al.*, 1996).

Actualmente, los genetistas se están enfocando en encontrar las mejores estrategias en mejoramiento, que consiste en combinar los genes *R*, con altos niveles de resistencia en campo, donde la cercana inmunidad conferida por los genes *R* sea utilizada hasta que ellos sean vencidos, y los altos niveles de resistencia se involucren luego en la operación junto con la resistencia residual de los genes *R* (Stewart *et al.*, 2003). Para un futuro inmediato, Solomon-Blackburn *et al.* (2007) sugieren que la mejor estrategia a fin de seleccionar altos niveles de resistencia en campo es probablemente con razas complejas disponibles de *P. infestans*. La segregación de una proporción grande de progenie susceptible sería un indicativo que un gen *R* enmascara un alto grado de susceptibilidad, razón suficiente para rechazar al

progenitor resistente. A largo plazo, cuantos más genes *R* y QTLs sean mapeados, y marcadores efectivos para ellos desarrollados, será más fácil combinar los genes de resistencia deseables que tengan efectos cualitativos con aquellos cuantitativos y que no estén asociados con la maduración tardía, lo cual permite la identificación, introgresión eficiente y selección de individuos con caracteres específicos.

Por lo tanto, el uso de especies silvestres diploides en papa en combinación con marcadores moleculares, ha simplificado los estudios de la herencia y ha hecho más factible su estudio genético. Comparado con la alta diversidad genética natural disponible en los parientes silvestres de la papa, sólo un número pequeño de estas especies han sido de ahora usadas para introgresión de caracteres de resistencia dentro de cultivares, ya que a veces esto conlleva a la introducción de caracteres “silvestres” indeseables junto con el carácter de resistencia. Además, el conocimiento de la posición en el mapa de genes *R* o QTL y de los marcadores basados en PCR cercanamente ligados, sirven como marcadores diagnóstico porque facilitan el rastreo y la combinación de factores de resistencia de diferentes fuentes, usando como progenitores genotipos resistentes de poblaciones de mapeo correspondientes (Gebhardt *et al.*, 2006).

Finalmente, el entendimiento de las bases genéticas y moleculares de la resistencia cuantitativa a través de poblaciones experimentales, abre la posibilidad de explorar información en la localización de factores genéticos positivos y negativos afectando la resistencia vía una estrategia asistida por marcadores, lo cual es muy importante para el aprovechamiento eficiente de la resistencia natural presente en los recursos genéticos. El discernimiento de los factores involucrados en la resistencia cuantitativa contra *P. infestans* constituye un paso primordial hecho posible por la utilización de todas las herramientas disponibles surgidas de los estudios de biología molecular, genética, bioinformática, estadística y otras ciencias más, y los aportes del presente trabajo constituyen parte de un trabajo integral llevado a cabo en el CIP, ejecutado con la finalidad de desarrollar cultivares de papa resistentes al principal agente de las pérdidas económicas que es *P. infestans*.

---

## Conclusiones

- ✘ La extrema resistencia a tizón tardío observada en campo en el progenitor femenino *S. paucisectum* 762126.227 no es transmitida a la progenie PCS1 como un factor genético dominante simple.
- ✘ La segregación sesgada de resistencia a tizón tardío en la progenie PCS1 se debe a la presencia de un gen supresor de la expresión de los genes *R* que podría venir del parental masculino.
- ✘ Es posible obtener perfiles polimórficos con suficiente número de bandas en la progenie PCS1 con la metodología del perfil NBS, encontrándose en ella un promedio en el nivel de polimorfismo de 9%.
- ✘ El perfil NBS5/*RsaI* proporciona mayor especificidad y efectividad, frente a las otras combinaciones de iniciador/enzima, mostrando 32.5% de fragmentos polimórficos.
- ✘ Los marcadores utilizados pueden ser usados como pruebas de diagnóstico basado en PCR por seleccionar alelos QTL específicos asociados a la resistencia a tizón tardío en la progenie PCS1 del cruce de las líneas parentales 762126.227 x 762124.236.
- ✘ Se obtuvieron 2 loci polimórficos ligados con la resistencia a *P. infestans*, mediante la amplificación por PCR de los iniciadores candidatos.



---

## Recomendaciones

- ✘ La hipótesis del gen supresor, considerando su presencia en trabajos previos, debería ser comprobada con nuevas poblaciones de papa con más individuos derivando del mismo progenitor fuente de la resistencia.
- ✘ La técnica del perfil NBS puede ser usada en otras especies con poca o ninguna modificación del protocolo establecido inicialmente. ya que constituye una técnica accesible, rápida, útil y confiable para la búsqueda de polimorfismo.
- ✘ Realizar un análisis utilizando más combinaciones de iniciador/enzima para obtener bandas polimórficas con más facilidad en el protocolo del perfil NBS.
- ✘ Se hace necesario secuenciar los marcadores NBS obtenidos en papa para poder establecer su conservación con algún RGA específico, así como su ubicación dentro del grupo de ligamiento respectivo.
- ✘ El uso de una *Taq* polimerasa con un inicio caliente “Hotstart” es esencial para obtener patrones de bandas de buena calidad donde una alta especificidad es requerida debido a los iniciadores empleados.
- ✘ Se recomienda emplear otros marcadores de loci candidatos en la caracterización de la resistencia a tizón tardío en la progenie diploide PCS1.
- ✘ Es necesario primero optimizar las condiciones de amplificación de los iniciadores candidatos para obtener productos específicos y ser informativos en otras progenies segregantes.

---

## Referencias Bibliográficas

- AARTS M, TE LINTEL HEKKERT B, HOLUB E, BEYNON J, STIEKEMA W, PEREIRA A. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 251–258.
- AGRIOS G. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA.
- ARESHCHENKOVA T. 2000. Isolation, characterization and mapping of microsatellites from the tomato genome and their application in molecular analysis of centromeric regions. PhD thesis, University of Halle-Wittenberg, Ukraine.
- ARMSTRONG M, WHISSON S, PRITCHARD L, BOS J, VENTER E, AVROVA A, REHMANY A, BÖHME U, BROOKS K, CHEREVACH I, HAMLIN N, WHITE B, FRASER A, LORD A, QUAIL M, CHURCHER C, HALL N, BERRIMAN M, HUANG S, KAMOUN S, BEYNON J, BIRCH P. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 102: 7766–7771.
- ASÍNS M. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281–291.
- BALLVORA A, ERCOLANO M, WEISS J, MEKSEM K, BORMANN C, OBERHAGEMANN P, SALAMINI F, GEBHARDT C. 2002. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *The Plant Journal* 30: 361–371.
- BLACK W. 1970. The nature of inheritance of field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in potatoes. *American Potato Journal* 47: 279–288.
- BIANCHI A, MORANDI A. 1962. A case of balanced lethal factors in maize. *Heredity* 17: 409–414.
- BORMANN C, RICKERT A, RUIZ R, PAAL J, LÜBECK J, STRAHWALD J, BUHR K, GEBHARDT C. 2004. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1126–1138.
- BRUGMANS B. 2005. Development of tools and strategies towards marker assisted selection and gene cloning. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- BRUGMANS B, WOUTERS D, VAN OS H, HUTTEN R, VAN DER LINDEN G, VISSER R, VAN ECK H, VAN DER VOSSEN E. 2008. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theoretical and Applied Genetics* DOI: 10.1007/s00122-008-0871-7.
- CALENGE F, VAN DER LINDEN C, VAN DE WEG E, SCHOUTEN H, VAN ARKEL G, DENANCÉ C, DUREL C.

2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 660–668.
- CAMPBELL C, MADDEN L.** 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, New York, USA, 532 pp.
- CHEN X, LINE R, LEUNG H.** 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 345–355.
- CHEN X.** 2000. Molecular mapping of genes involved in carbohydrate metabolism and fluorescent AFLP-based tagging of QTL in tetraploid potato. PhD thesis, University zu Köln, Köln, Germany.
- CIP.** 2001. Informe Anual del Centro Internacional de la Papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima-Perú.
- COLLINS A, MILBOURNE D, RAMSAY L, MEYER R, CHATOT-BALANDRAS C, DE JONG W, OBERHAGEMANN P, GEBHARDT C, BONNEL E, WAUGH R.** 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* 5: 387–398.
- COLLINS N, WEBB C, SEAH S, ELLIS J, HULBERT S, PRYOR A.** 1998. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 968–978.
- COLON L, BUDDING D, KEIZER P, PIETERS M.** 1995. Components of resistance to late blight *P. infestans* in eight South American species. *European Journal of Plant Pathology* 101: 441–456.
- COLQUE C.** 1996. Caracterización de genes de virulencia de poblaciones de *Phytophthora infestans* de Bary que infectan papa y determinación de la resistencia en *Solanum* spp. Tesis para optar el título de Ingeniero agrónomo. Universidad Mayor de San Simon. Lima, Perú.
- DANGL J, JONES J.** 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- DEAHL K, INGLIS D, DEMUTH S.** 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from northwestern Washington. *American Journal of Potato Research* 70:779–795.
- DENG Z, HUANG S, LING P, CHEN C, YU C, WEBER C, MOORE G, GMITTER F.** 2000. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequence in citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 814–822.
- DONALD T, PELLERONE F, ADAM-BLONDON A, BOUQUET A, THOMAS M, DRY I.** 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 301–308.
- EL-KHARBOTLY A, LEONARDS-SCHIPPERS C, HUIGEN D, JACOBSEN E, PEREIRA A, STIEKEMA W, SALAMINI F, GEBHARDT C.** 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the *R1* and *R3* alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid

- potato parents. *Molecular and General Genetics*. 242: 749-754.
- EL-KHARBOTLY A, PALOMINO-SÁNCHEZ C, SALAMINI F, JACOBSEN E, GEBHARDT C. 1996. *R6* and *R7* alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary identified genetic loci clustering with the *R3* locus on chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 880-884.
- EL-KHARBOTLY A, PEREIRA A, STIEKEMA W, JACOBSEN E. 1996. Race specific resistance against *Phytophthora infestans* in potato is controlled by more genetic factors than only *R*-genes. *Euphytica* 90: 331-336.
- ERWIN D, RIBEIRO O. 1996. *Phytophthora*: Diseases worldwide. American Phytopathological Society, Saint Paul, MN. 562 pp.
- EWING E, SIMKO I, SMART C, BONIERBALE M, MIZUBUTI E, MAY G, FRY W. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Molecular Breeding* 6: 25-36.
- FALOONA F, MULLIS K. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- FERREIRA M, GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa, Brasilia, Brasil. 221 pp.
- FLOR H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9: 275-296.
- FORD-LLOYD B, PAINTING K. 1996. Measuring Genetic Variation Using Molecular Markers Version 1.2. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome, Italia.
- FRY W, GOODWIN S. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 47: 363-371.
- FRY W, MIZUBUTI E. 1998. Potato late blight. *In: The Epidemiology of plant diseases*. Kluwer Publishers. pp 371-388.
- GARELIK G. 2002. Agriculture. Taking the bite out of potato blight. *Science* 298: 1702-4.
- GEBHARDT C, RITTER E, BARONE A, DEBENER T, WALKEMEIER B, SCHACHTSCHABEL U, KAUFMANN H, THOMPSON R, BONIERBALE M, GANAL M, TANKSLEY S, SALAMINI F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics* 83:49-57.
- GEBHARDT C, VALKONEN J. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review Phytopathology* 39: 79-102.
- GEBHARDT C, BALLVORA A, WALKEMEIER B, OBERHAGEMANN P, SCHÜLLER K. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13: 93-102.

- GEBHARDT C, BELLIN D, HENSELEWSKI H, LEHMANN W, SCHWARZFISCHER J, VALKONEN J. 2006. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1458-1464.
- GEFFROY V, SÉVIGNAC M, OLIVEIRA J, FOUILLOUX G, SKROCH P, THOQUET P, GEPTS P, LANGIN T, DRON M. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 287-296.
- GHISLAIN M, TROGNITZ B, HERRERA R, HURTADO O, PORTAL L. 1997. DNA markers for the introgression of late blight resistance in potato. *In*: International Potato Center Program Report 1995-1996. Lima, Peru. pp 84-89.
- GHISLAIN M, TROGNITZ B, HERRERA R, SOLIS J, CASALLO G, VÁSQUEZ C, HURTADO O, CASTILLO R, PORTAL L, ORRILLO M. 2001. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *Solanum tuberosum* grown under short-day conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 433-442.
- GRUBE R, RADWANSKI E, JAHN M. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* 155: 873-887.
- GRUNWALD N, FLIER W, STURBAUM A, GARAY-SERRANO E, VAN DEN BOSCH T, SMART C, FRY W, MATUSZAK J, LOZOYA-SALDANA H, TURKENSTEEN L. 2001. Population structure of *P. infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology* 91: 882-890.
- HAYES A, SAGHAI MAROOF M. 2000. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1279-1283.
- HAWKES J. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London, UK.
- HAWKES J. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. *Potato Genetics*. CAB International University Press, Cambridge, UK.
- HE L, DU C, COVALEDA L, XU Z, ROBINSON A, YU J, KOHEL R, ZHANG H. 2004. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LRR-encoding resistance gene analogue family in polyploidy cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1234-1241.
- HORTON D. 1992. La Papa: Producción, comercialización y programas. Copublicación del CIP-Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur SRL. Montevideo, Uruguay. 260 pp.
- HUANG S, VLEESHOUWERS V, WERIJ J, HUTTEN R, VAN ECK H, VISSER R, JACOBSEN E. 2004. The *R3* Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato is conferred by Two Closely Linked *R* Genes with Distinct Specificities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 428-435.
- HUANG S, VAN DER VOSSEN E, KUANG H, VLEESHOUWERS V, ZHANG N, BORM T, VAN ECK H, BAKER B, JACOBSEN E, VISSER R. 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *The Plant Journal* 42: 251-261.

- HUNGER S, GASPERO G, MÖHRING S, Bellin D, SCHÄFER-PREGL R, BORCHARDT D, DUREL C, WERBER M, WEISSHAAR B, SALAMINI F, SCHNEIDER K. 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* 46: 70-82.
- INGRAM D, WILLIAMS P. 1991. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press, New York.
- JANSKY, S. 2000. Breeding for disease resistance in potato. *Plant Breeding Review* 19: 69-155.
- JANSKY, S.; SIMON, R.; SPOONER, D. 2008. A Test of Taxonomic Predictivity: Resistance to Early Blight in Wild Relatives of Cultivated Potato. *Phytopathology* 98 (6): 680-687.
- JONES D, JONES J. 1997. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. *Advances in Botanical Research* 24: 89-167.
- JUDELSON H. 1997. The genetics and Biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal genetics and Biology* 22: 65-76.
- KAMOUN S, SMART C. 2005. Late Blight of Potato and Tomato in the Genomics Era. *Plant Disease* 89(7): 692-699.
- KANAZIN V, MAREK L, SHOEMAKER R. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 93: 11746-11750.
- KEEN N. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447-463.
- KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCO C, VREUGDENHIL D. 2004. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55: 141-172.
- KUHL J, HANNEMAN R, HAVEY M. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Molecular Genetics Genomics* 265: 977-985.
- KUHN D, HEATH M, WISSER R, MEEROW A, BROWN J, LOPES U, SCHNELL R. 2003. Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 191-202.
- LAPWOOD D. 1977. Factors affecting the field infection of potato tubers of different cultivars by blight (*P. infestans*). *Annals of Applied Biology* 85: 23-42.
- LEISTER D, BALLVORA A, SALAMINI F, GEBHARDT C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics* 14: 421-429.
- LEONARDS-SCHIPPERS C, GIEFFER W, SALAMINI F, GEBHARDT C. 1992. The *R1* gene conferring race specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Molecular and General Genetics* 233: 278-283.
- LEONARDS-SCHIPPERS C, GIEFFER W, SCHAEFER-PREGL R, RITTER E, KNAPP S, SALAMINI F, GEBHARDT C. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for

- QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137: 67-77.
- LEVEBVRE V, PALLOIX A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 503-511.
- LI X, VAN ECK H, ROUPPE VAN DER VOORT J, HUIGEN D, STAM P, Jacobsen E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1121-1128.
- MALCOLMSON J, BLACK W. 1966. New R-genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199-203.
- MALOSETTI M. 2006. Mixed model methodology for the identification of genetical factors underlying trait variation in plants. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- MALOSETTI M, VAN DER LINDEN C, VOSMAN B, VAN EEUWIJK F. 2007. A Mixed-Model Approach to Association Mapping Using Pedigree Information with an Illustration of Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato. *Genetics* 175: 879-889.
- MANTOVANI P, VAN DER LINDEN C, MACCAFERRI M, SANGUINETI M, TUBEROSA R. 2006. Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat. *Genome* 49: 1473-1480.
- MARCZEWSKI W, FLIS B, SYLLER J, SCHAFER-PREGL R, GEBHARDT C. 2001. A major quantitative trait locus for resistance to Potato leafroll virus is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to N-gene-like markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1420-1425.
- MARTIN G, BOGDANOVA A, SESSA G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review Plant Biology* 54: 23-61.
- MCDOWELL J, WOFFENDEN B. 2003. Plant Disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in biotechnology* 21: 178-183.
- MEYERS B, CHIN D, SHEN K, SIVARAMAKRISHNAN S, LAVELLE D, ZHANG Z, MITCHELMORE R. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10: 1817-1832.
- MEYERS B, DICKERMAN A, MITCHELMORE R, SIVARAMAKRISHNAN S, SOBRAL B, YOUNG N. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* 20: 317-332.
- MEYERS B, KOZIK A, GRIEGO A, KUANG H, MICHELMORE R. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 809-834.
- MICHELMORE R, MEYERS B. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent

- p selection and a birth-and-death process.
- Genome Research*
- 8: 1113–1130.
- MONOSI B, WISSER R, PENNILL L, HULBERT S.** 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1434–1447.
- MOSS D.** 1982. Isoenzymes. Capman and Hall.
- MURASHIGE T, SKOOG F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 251–258.
- NAESS S, BRADEEN J, WIELGUS S, HABERLACH G, HELGESON J.** 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 697–704.
- OBERHAGEMANN P, CHATOT-BALANDRAS C, SCHÄFER-PREGL R, WEGENER D, PALOMINO C, SALAMINI F, BONNEL E, GEBHARDT C.** 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late-blight in potato: towards marker-assisted selection. *Molecular Breeding* 5: 399–415.
- OCHOA C.** 1999. Las papas de Sudamérica: Perú (Parte 1). CIP. Lima, Perú. 461 pp.
- ORDÓÑEZ M, FORBES G, TROGNITZ B.** 1997. Resistance to late blight in potato. A putative gene that suppresses *R* genes and is elicited by specific isolates. *Euphytica* 95: 167–172.
- PAN Q, LIU Y, BUDAI-HADRIAN O, SELA M, CARMAL-GOREN L, ZAMIR D, FLUHR R.** 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and Arabidopsis. *Genetics* 155: 309–322.
- PARAN I, ZAMIR D.** 2003. Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends in Genetics* 19: 303–306.
- PARK T, GROS J, SIKKEMA A, VLEESHOUWERS V, MUSKENS M, ALLEFS S, JACOBSEN E, VISSER R, VAN DER VOSSEN E.** 2005a. The late blight resistance locus *Rpi-bib3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight *R* gene cluster on chromosome 4 of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 722–729.
- PARLEVLIET J.** 1997. Durable resistance. In: Resistance of crop plant against fungi. Edited by H. Hartleb, R. Heitefuss and H. Hoppe. pp 239–253.
- PÉREZ W, FORBES G.** 2008. Manual Técnico del CIP. El tizón tardío de la papa.
- PFLIEGER S, LEFEBVRE V, CAUSSE M.** 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7: 275–291.
- QIANG X, XIAOPENG W, XIUXIN D.** 2005. Isolation of TIR and nonTIR NBS–LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 819–830.
- RAMAN R, ASH G, WRATTEN N, RAMAN H.** 1999. Comparative analysis of resistance gene analogs in *Brassica napus* L. proc. Rapeseed congress.
- ROBINSON R.** 1996. Return to resistance: Breeding crops to reduce pesticide dependence Ag.



Access, Davis, CA. USA, 480 pp.

- ROSS H.** 1986. Potato breeding-Problems and perspectives. *In: Advances in Plant Breeding. Journal of Plant Breeding. Vol. 13. Edited by W. Horn and G. Röbbelen.* Verlag Paul Parey, Berlin, Germany. 132 pp.
- SALAMAN R.** 1985. The potato famine: its causes and consequences. *In: The History and Social Influence of the potato. Edited by J. Hawkes.* Cambridge University Press, Cambridge/New York. pp 289-316.
- SAMBORSKI D.** 1985. Wheat leaf rust. *In: The cereal rusts. Vol. 11. Diseases, distribution, epidemiology, and control. Edited by A. Roelfs, and W. Bushnell.* Academic Press, Orlando, Fla. pp 39-59.
- SANDBRINK J, COLON L, WOLTERS P, STIEKEMA W.** 2000. Two related genotypes of *Solanum microdontum* carry different segregating alleles for field resistance to *Phytophthora infestans*. *Molecular Breeding* 6: 215-225.
- SHEN K, MEYERS B, ISLAM/FARIDI M, CHIN D, STELLY D, MITCHELMORE R.** 1998. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 815-823.
- SMILDE W, BRIGNETI G, JAGGER L, PERKINS S, JONES J.** 2005. *Solanum mochiquiense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 252-258.
- SOLOMON-BLACKBURN R, STEWART H, BRADSHAW J.** 2007. Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 141-149.
- SONG J, BRADEEN J, NAESE S, RAASCH J, WIELGUS S, HABERLACH G, LIU J, KUANG H, AUSTIN-PHILLIPS S, BUELL C, HELGESON J, JIANG J.** 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 100: 9128-9133.
- SPEULMAN E, BOUCHEZ D, HOLUB E, BEYNON J.** 1998. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14: 467-474.
- SPOONER D, VAN DEN BERG R.** 1992. An analysis of recent taxonomic concepts in wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 39: 23-37.
- SPOONER D, CASTILLO R.** 1997. Reexamination of series relationships of South American wild potatoes (*Solanaceae: Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal of Botany* 84: 671-685.
- SPOONER D, HIJMANS R.** 2001. Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research* 78: 237-268.
- STEWART H, BRADSHAW J, PANDE B.** 2003. The effect of the presence of *R*-genes for resistance to

- late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology* 52: 193–198.
- STRICKBERGER M. 1976. Genetics. 2<sup>da</sup> ed. MacMillan Publishing Co., Inc. Nueva York, London. 914 pp.
- SYED N, SØRENSEN A, ANTONISE R, VAN DE WIEL C, VAN DER LINDEN C, VAN ‘T WESTENDE W, HOOFTMAN D, DEN NIJS H, FLAVELL A. 2006. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 517–527.
- TAGI. 2000. The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 6814: 796–815.
- TAMELING W, ELZINGA S, DARMIN P, VOSSEN J, TAKKEN F, HARLING M, CORNELISSEN B. 2002. The tomato *R* gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14: 2929–2939.
- TANHUANPAA P. 2004. Identification and mapping of resistance gene analogs and a white rust resistance locus in *Brassica rapa* ssp. *Oleifera*. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1039–1046.
- TIAN Y, FAN L, THURAU T, JUNG C, CAI D. 2004. The absence of TIR-type resistance gene analogues in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genome. *Journal of Molecular Evolution* 58: 40–53.
- TROGNITZ F, MANOSALVA M, GYSIN R, NINO-LIU D, SIMON R, HERRERA M, TROGNITZ B, GHISLAIN M, NELSON R. 2001. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 587–597.
- TURKENSTEEN L. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In: Durability of Disease Resistance. Edited by T. Jacobs and J. Parlevliet. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 115–124.
- UMAREUS V, UMAREUS M. 1994. Inheritance of resistance to late blight. In: Potato Genetics. Edited by J. Bradshaw and G. Mackay. CAB International, Wallingford, UK. pp 365–401.
- VALENTINOVA E. 2005. Molecular Genetic and Functional Characterization of candidate loci for controlling quantitative resistance to the oomycete *Phytophthora infestans*. PhD thesis, University zu Koln, Koln, Germany.
- VAN DER BIEZEN E, SUN J, COLEMAN M, BIBB M, JONES J. 2000. *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 97: 3747–3752.
- VAN DER LINDEN G, WOUTERS D, MIHALKA V, KOCHIEVA E, SMULDERS M, VOSMAN B. 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 384–393.
- VAN DER VOSSEN E, SIKKEMA A, HEKKERT B, GROS J, STEVENS P, MUSKENS M, WOUTERS D,

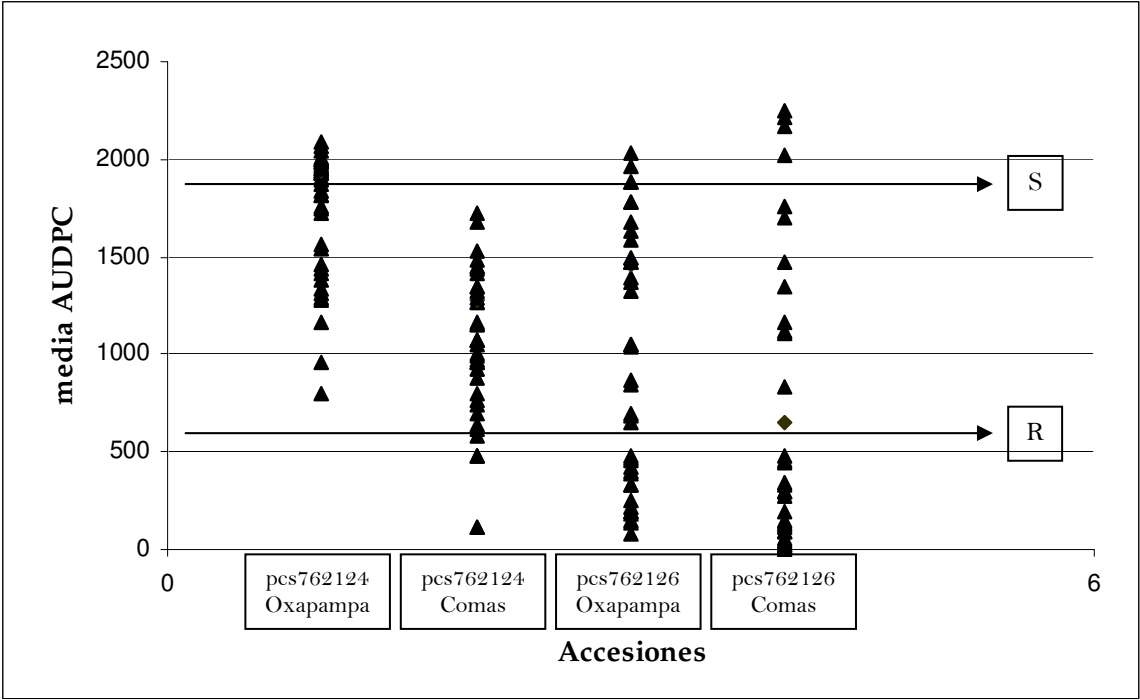
- PEREIRA A, STIEKEMA W, ALLEFS S.** 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *The Plant Journal* 36: 867-882.
- VAN DER VOSSEN E, GROS J, SIKKEMA A, MUSKENS M, WOUTERS D, PEREIRA A, ALLEFS S.** 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *The Plant Journal* 44: 208-222.
- VAN ECK H.** 1995. Localisation of morphological traits on the genetic map of potato using RFLPs and isozyme markers. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- VILLAMON F, SPOONER D, ORRILLO M, MIHOVLOVICH E, PEREZ W, BONIERBALE M.** 2005. Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucissectum* (series *Piurana*). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1201-1214.
- VISKER M, KEIZER L, VAN ECK H, JACOBSEN E, COLON L, STRUIK P.** 2003a. Can the QTL for late blight resistance on potato chromosome 5 be attributed to foliage maturity type? *Theoretical and Applied Genetics* 106: 317-325.
- VLEESHOWERS V, VAN DOOLJEWEERT W, KEIZER L, SIJPKES L, GOVERS F, DOS PUNTOS L.** 1999. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European Journal of Plant Pathology* 105: 241-250.
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DER LEE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.
- WASTIE R.** 1991. Breeding for resistance. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. Edited by D. Ingram and P. Williams. Academic Press, London, UK. pp 193-224.
- YU Y, BUSS G, SAGHAI MAROOF M.** 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 93: 11751-11756.

**FUENTES DE INTERNET ONLINE:**

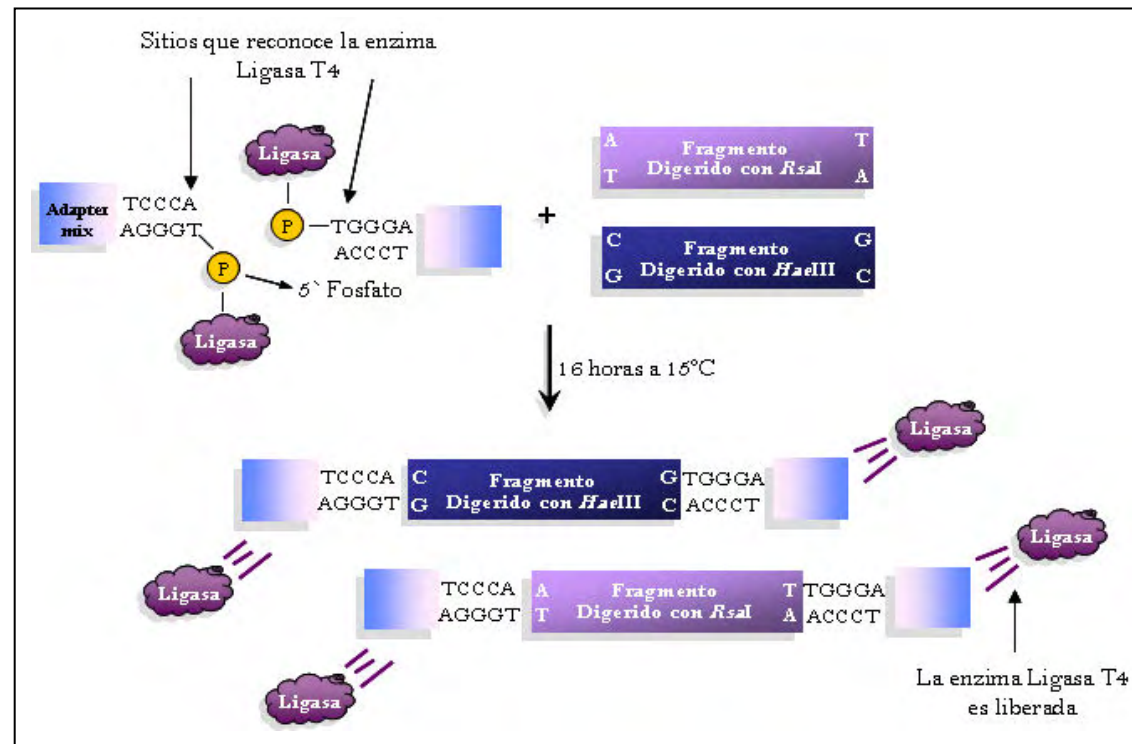
- AIP.** 2008. Año Internacional de la papa. <http://www.potato2008.org>
- FAOSTAT.** 2008. Base de Datos Estadísticos en línea. <http://faostat.fao.org>
- GILB.** 2004. Global initiative on late blight. <http://gilb.cip.cgiar.org>
- GRIN.** 2008. Germplasm Resource Information Network. <http://www.ars-grin.gov>
- MINAG.** 2008. Ministerio de Agricultura. Portal Agrario. <http://www.minag.gob.pe>
- NHGRI.** 2008. The National Human Genome Research Institute. <http://www.genome.gov>

# Apéndice

## APÉNDICE 1 Figuras



**Figura 9.1.** Resumen de los valores medios AUDPC de los 40 genotipos de cada una de las dos accesiones de *S. paucisectum* para el tizón tardío bajo condiciones endémicas en dos localidades del Perú. Cada *triangulo* representa la media AUDPC de un genotipo de cuatro replicaciones en ambos lugares. Las *líneas* indicando “S” y “R” corresponden a los valores medios AUDPC de los controles.



**Figura 9.2.** Esquema de la ligación de los fragmentos de restricción al adapter mix por medio de la enzima Ligasa T4.

## APÉNDICE 2 Preparación del medio de cultivo MSA

1. Colocar en un beaker 1000 ml (1L) de agua destilada y empezar a agitar.
2. Disolver 25 g/L de sucrosa.
3. Agregar 4.4 g/L del medio basal MS.
4. Luego verter 5 ml del stock MSA (ver preparación del stock MSA).
5. Ajustar el pH a 5.6 con NaOH 5M.
6. Completar con agua destilada al volumen de 1 litro.
7. Agregar 3 g/L de phytigel y seguir agitando hasta disolver todo.
8. Colocar en el microondas durante 20 min hasta antes de hervir.
9. Dispensar en tubos de ensayo (Pirex®) 5 ml del medio de cultivo MSA.
10. Autoclavar en ciclo líquido los tubos por 20 min a 125°C y 15 lbs/plg<sup>2</sup>.
11. Dejar enfriar a temperatura ambiente (TA) y luego almacenar los tubos a 4°C hasta su uso.

### Stock MSA

Para 1 litro:

Disolver 0.02 g de ácido giberélico, 0.6 g de glicina, 0.15 g de ácido nicotínico, 0.15 g de piridoxina y 0.12 g de tiamina HCl en 950 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M y llevar a 1 litro el volumen final.

### APÉNDICE 3 Protocolo de extracción de ADN a mediana escala

**Nota:** Este protocolo es usado rutinariamente en el laboratorio. Con extracciones de 4 g de muestra se podrá obtener alrededor de 400 µg de ADN total.

1. Pesar 4 g de hojas frescas o de plántulas de *in vitro*. Molerlas en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido, esto permite romper las paredes y membranas celulares con más facilidad cuando son trituradas en morteros, hasta obtener un polvo fino. Seguidamente, transferir el polvo (tejido vegetal) a un tubo falcon de 50 ml que contenga 20 ml del tampón de extracción CTAB 2X y 200 µl de β-mercaptoetanol (agregar sólo antes de usarse). El CTAB es un detergente catiónico que solubiliza las membranas celulares y forma un complejo con el ADN.
2. Incubar en agitación continua a 65°C en baño María durante 20 min.
3. Dejar enfriar a TA por 10 min. Agregar igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Este solvente orgánico es utilizado para extraer los lípidos y proteínas. Invertir suavemente el tubo continuamente durante 5 min.
4. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 min a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 50 ml.
6. Agregar igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar invirtiendo suavemente el tubo durante 5 min.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 min a 4°C.
8. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo conteniendo 2/3 del volumen (15 ml aprox.) de isopropanol frío e invertir el tubo suavemente, con la finalidad que el ADN sea precipitado en forma de hebras o sedimentado (*pellet*).
9. Dejar precipitar el ADN por 30 min a 4°C.
10. Pescar la “medusa” de ADN con una bagueta de vidrio o pipeta Pasteur.
11. Transferir el precipitado de ADN a un tubo Eppendorf de 1.7 ml conteniendo 300-500 µl de solución Lavado 1 (etanol 70%). Dejar 20 min a TA.
12. Transferir el precipitado de ADN a un nuevo tubo Eppendorf de 1.7 ml con 300-500 µl de solución Lavado 2 (etanol 95%). Dejar 5 seg.
13. Transferir la medusa de ADN a un tubo Eppendorf final y dejar secar a TA por 30-60 min con la tapa abierta.
14. Resuspender el ADN en 500 a 1000 µl de solución tampón T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-EDTA), dependiendo de la cantidad de ADN.
15. Añadir 5-10 µl de ARNasa (10mg/ml) e incubar por 60 min a 37°C.
16. Finalmente, almacenar las muestras a 4°C para uso inmediato ó a -20°C para conservarlas por periodos largos.

APÉNDICE 4 Perfil NBS

La técnica NBS en ADN genómico de la progenie PCS1 fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo descrito en van der Linden *et al.* (2004) con algunas modificaciones. La técnica consta de cinco etapas:

- 1. Digestión del ADN
  - a. Agregar en un tubo para microcentrífuga de 1.7 ml:

Reactivos	1Rx (µl)
Buffer de la enzima 10X	2.0
Enz. <i>RsaI</i> / <i>AluI</i> / <i>HaeIII</i> (10U/µl)	0.5
Agua libre de nucleasas (NFW)	12.5
ADN de la muestra (50ng/µl)	5.0
Total	20.0

- b. Incubar a 37°C por 3 horas y luego inactivar la enzima a 65°C por 15 min.
  - c. Verificar la digestión corriendo 5 µl de cada muestra más 10 µl de tampón de carga SALB 1X en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V por una hora con tampón TBE 1X circulante, y visualizar las bandas con radiación UV.

- 2. Ligación de adaptadores
  - a. Síntesis del adaptador (Figura 9.2):

Adaptador de extremos romos (*RsaI*/*AluI*/*HaeIII*):  
5'- ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA -3'  
NH<sub>2</sub>-3'- TTCATATCTAGGGT -5'-P

**Síntesis del adaptador**

Para un volumen de 200 µl mezclar:

100 µl de cada una de las cadenas de los adaptadores de 100 µM. Incubar la mezcla por 5 min a 95°C e ir bajando la T °C lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Luego mantener a 4°C hasta su uso.

- b. Añadir en un tubo para microcentrífuga de 1.7 ml:



Reactivos	1Rx (μl)
Buffer 5X para ligasa	4.0
Enzima ADN T4 ligasa (5U/μl)	0.5
Mezcla de adaptadores (50pmol)	1.0
Agua libre de nucleasas (NFW)	4.5
ADN digerido	10.0
Total	20.0

- c. Mezclar bien y pipetear cuidadosamente la solución.
  - d. Incubar a 15°C por 16 horas (toda la noche).
  - e. Diluir las muestras 1:10 en tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>.
  - f. Almacenar a −20°C hasta su uso.
3. Amplificación asimétrica de los fragmentos ligados a los adaptadores
- a. Mezclar en un tubo para microcentrífuga de 1.7 ml:

Reactivos	1Rx (μl)
Buffer 10X PCR	2.5
Mgcl <sub>2</sub> (50mM)	0.75
dNTP's (5mM)	1.0
Iniciador NBS (10μM)	2.0
Iniciador adaptador (10μM)	2.0
Platinum Taq ADN polimerasa (5U/μl)	0.08
Agua libre de nucleasas (NFW)	11.67
	20.0
Templado	5.0
Total	25.0

- b. Mezclar bien y dar un leve *spin down*.
- c. Colocar en un Termociclador pre-calentado a 95°C con el siguiente programa:

1. 5 minutos a 95°C
2. 30 segundos a 95°C
3. 1 min 40 seg a T <sub>a</sub> (Ver Tabla 2)
4. 2 minutos a 72°C
5. Repetir 34 veces los pasos 2, 3 y 4
6. 10 minutos a 72°C
7. Mantener a 10°C hasta retirar la placa

- d. Finalizado el programa, cargar 15 µl de los productos de PCR adicionando 2 µl de tampón de carga SALB 10X en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, a 100 V, y las bandas visualizarlas con radiación UV. Esto debe resultar en un “smear” con fragmentos de diferente tamaño.
- e. Diluir 1:10 los productos amplificados restantes de la muestra (10 µl) en tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> para la amplificación exponencial.
- f. Almacenar las muestras a −20°C hasta su uso.

#### 4. Amplificación exponencial

Para la detección por el método radioactivo de los productos de amplificación, se debe realizar el marcaje radioactivo del iniciador NBS con P<sup>33</sup>.

##### 4.1 Marcaje del iniciador NBS

- a. Mezclar en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml:

Reactivos	1Rx (µl)
Buffer T4 forward 5X	0.1
Iniciador NBS específico (10µl)	0.1
Agua libre de nucleasas (NFW)	0.19
T4 kinasa (10U/µl)	0.01
γ-P <sup>33</sup> ATP (10µCi/µl)	0.1
Total	0.5

- b. Incubar la mezcla a 37°C por 1 hora y luego inactivar la kinasa a 70°C por 10 min.

##### 4.2 Amplificación exponencial

- a. Mezclar en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

Reactivos	1Rx (µl)
Buffer 10X PCR	2.0
Mgcl <sub>2</sub> (50mM)	0.6
dNTP's (5mM)	0.8
Iniciador NBS marcado	0.5
Iniciador adaptador (10µM)	0.2
Platinum <i>Taq</i> ADN polimerasa (5U/µl)	0.08
Agua libre de nucleasas (NFW)	10.82
	15.0
Templado (1:10)	5.0
Total	20.0

- b. Colocar las muestras en un termociclador pre-calentado a 95°C con el siguiente programa:

1. 5 minutos a 95°C
2. 30 segundos a 95°C
3. 1 min 40 seg a T<sub>a</sub> (Ver Tabla 2)
4. 2 minutos a 72°C
5. Repetir 34 veces los pasos 2, 3 y 4
6. 10 minutos a 72°C
7. Mantener a 10°C hasta retirar la placa

##### 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

- a. Adicionar la mitad de volumen (10 µl) de tampón de carga (Dye) a los 20 µl de cada una de las muestras marcadas y luego denaturarlas por 5 min a 95°C.

Inmediatamente las muestras son colocadas sobre hielo para su enfriamiento antes de cargarlas en el gel.

- b. Cargar 7 µl de cada una de las muestras marcadas en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%, 7M urea, tan rápido como sea posible.
- c. Correr el gel a 4 W y a un voltaje que oscile entre los 400 V y 450 V durante toda la noche “overnight”, por un tiempo de corrida de 16 a 18 horas (dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN). Se utilizará un gradiente de tampón TBE a una concentración de 0.5X en el cátodo y a una concentración de 1X en el ánodo, en cámaras verticales modelo S2 (Gibco-BRL).
- d. Los fragmentos individuales son visualizados por autorradiografía. Para lo cual se realiza la fijación del ADN finalizada la corrida electroforética, donde la placa chica del gel es fijada en ácido acético al 10% con agitación homogénea de 20 a 30 minutos (este paso es crítico para la precipitación del ADN y la eliminación de urea). Luego dejar secar el gel.
- e. Cubrir el gel seco con una película de rayos X (Kodak) y mantener en oscuridad por 2-7 días.
- f. Revelar la película.

##### 6. Revelado de la autorradiografía

El revelado se realiza en un cuarto oscuro.

- a. Revelado: exponer a la solución reveladora por 5 min o hasta que alcance la nitidez y contraste deseado de las bandas.
- b. Lavado: 30 segundos bajo agua corriente continua entre 16 y 24°C.
- c. Fijación: exponer a la solución fijadora de 5 a 10 min con agitación moderada.
- d. Lavado: de 5 a 10 min bajo agua corriente continua entre 16 y 24°C.
- e. Secado: se deja la película en un sitio exento de polvo a TA hasta que este seca.

APÉNDICE 5 Análisis de marcadores de genes candidatos basados en PCR

1. Dilución de los iniciadores a 10 µM:

Iniciador (F) y (R)	[Ci] Stock	[Cf]	Volumen (µl) Iniciador	Volumen (µl) Agua
GP23	100 µM	10 µM	50	450
GP180	100 µM	10 µM	50	450
CosA	100 µM	10 µM	50	450
CP113	100 µM	10 µM	50	450
GP21	100 µM	10 µM	50	450
GP179	100 µM	10 µM	50	450
BA121o1t7	100 µM	10 µM	50	450
BA4f2	100 µM	10 µM	50	450
57t3	100 µM	10 µM	50	450
GP125	100 µM	10 µM	50	450
NL27	100 µM	10 µM	50	450
NL25	100 µM	10 µM	50	450
C2AT	100 µM	10 µM	50	450
LE-HB-t7	100 µM	10 µM	50	450
CP60	100 µM	10 µM	50	450

2. Optimización de las Ta de los iniciadores:

Se debe utilizar un programa de amplificación estándar para las pruebas de amplificación de los iniciadores. Si los patrones de bandas no fueran claros o difíciles de discernir se harán pruebas variando las concentraciones de los distintos componentes de la reacción de PCR. Para determinar las óptimas temperaturas de apareamiento de los iniciadores, utilizar un termociclador de gradiente PTC 200 que plotee 12 temperaturas en el rango de 45 a 65°C.

1. 45.0 °C	4. 48.2 °C	7. 55.8 °C	10. 63.1 °C
2. 45.3 °C	5. 50.4 °C	8. 58.5 °C	11. 64.7 °C
3. 46.4 °C	6. 53.0 °C	9. 61.0 °C	12. 65.6 °C

- a. Emplear las condiciones de amplificación (Bormann *et al.*, 2004), para encontrar la temperatura óptima de apareamiento de cada par de los 12 iniciadores. Para ello mezclar en un tubo de microcentrífuga de 1.7 ml lo siguiente:

Reactivos	1Rx (μl)
Buffer 10X PCR	1.0
Mgcl <sub>2</sub> (25mM)	0.8
dNTP's (10mM)	0.2
Iniciador Forward (10μM)	0.25
Iniciador Reverse (10μM)	0.25
Taq ADN polimerasa P <sub>1+4</sub>	0.1
Agua libre de nucleasas (NFW)	2.4
	5.0
ADN (10 ng/μl)	5.0
Total	10.0

b. Mezclar bien y dar un suave *spin down* y colocar las muestras en el termociclador de gradiente PTC 200, dando un rango de temperatura mínima y alta, para generar 12 temperaturas diferentes bajo las siguientes condiciones del programa:

1. 2 minutos a 93°C
  2. 45 segundos a 93°C
  3. 45 segundos a (50 ±10)°C
  4. 1 min 30 seg a 72°C
  5. Repetir 34 veces los pasos 2, 3 y 4
  6. 10 minutos a 72°C
  7. Mantener a 10°C hasta retirar la placa

c. Finalizado el programa, se agrega 1μl de tampón de carga SALB 10X y se corre en un gel de agarosa al 1% con tampón de corrida TBE 1X circulante, aplicando 110 V durante 90 minutos.

d. De acuerdo a la imagen captada, se procede a la elección de la temperatura de apareamiento óptima de cada par de iniciadores.

3. Optimización de las condiciones de reacción de los iniciadores:
- Se estandarizó las condiciones de reacción partiéndose del programa de amplificación para marcadores basados por PCR (Bormann *et al.*, 2004), ajustándose algunos parámetros como el número de ciclos y el tiempo de cada etapa de amplificación para algunos iniciadores.
4. Amplificación de productos de PCR:
- a. Mezclar en un tubo de microcentrífuga de 1.7 ml:

Reactivos	1Rx (μl)
Buffer 10X PCR	3.0
Mgcl <sub>2</sub> (25mM)	2.4
dNTP's (10mM)	0.6
Iniciador F (10μM)	0.75
Iniciador R (10μM)	0.75
Taq ADN polimerasa P <sub>1+4</sub>	0.1
Agua libre de nucleasas (NFW)	17.4
	25.0
ADN (10 ng/μl)	5.0
Total	30.0

b. Dar un suave *spin down* y colocar las muestras en el termociclador con las condiciones del programa previamente estandarizadas.

1. 2 minutos a 93°C
  2. 45 segundos a 93°C
  3. 45 segundos a la respectiva *Ta* (Tabla 3.3)
  4. 1 min 30 seg a 72°C
  5. Repetir 34-39 veces los pasos 2, 3 y 4
  6. 10 minutos a 72°C
  7. Mantener a 10°C hasta retirar la placa

c. Tomar 10 μl del amplificado y agregar 1μl de tampón de carga SALB 10X, estos son separados por electroforesis en geles de agarosa 1% junto con un marcador de peso molecular conocido de 100 pb y visualizados por tinción con bromuro de etidio a diferentes voltajes y periodos de tiempo de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos.

## APÉNDICE 6 Preparación y electroforesis del gel de secuenciamiento

### 1. Preparación de la placa pequeña de vidrio

- a. Limpiar meticulosamente la placa de vidrio (40 x 33 x 0.5 cm). Lavarla primero con agua para remover residuos y después darle una limpieza final con alcohol al 96%. Dejar secar.
- b. En un tubo de microcentrífuga, preparar la solución de adhesión mezclando 7.5 µl de Bind Silane y 7.5 µl de ácido acético glacial en 1.5 ml de alcohol al 96%. Dar un leve *spin down* a la mezcla.
- c. Esparcir la solución de adhesión sobre la placa de vidrio con la ayuda de un papel tissue o papel KimWipes®, para covalentemente unir el gel hacia la placa de vidrio. Estar seguro que la placa esta completamente cubierta con la solución.
- d. Dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
- e. Momentos antes de iniciar el ensamblaje de los 2 vidrios, remover las partículas de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha primero en una dirección y luego perpendicularmente a la primera, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Bind Silane y el gel podría no adherirse.

### 2. Preparación de la placa grande de vidrio

- a. Limpiar meticulosamente la placa de vidrio (42 x 33 x 0.5 cm), primero con agua y luego con alcohol al 96%. Dejar secar. Es recomendable cambiar de guantes para evitar la contaminación con la solución adherente.
- b. Usando un papel tissue o papel KimWipes® humedecido con Repel Silane (Sigma), solución que evita que el gel se adhiera al vidrio, esparcir sobre la placa. Asegurarse que ésta este completamente cubierta.
- c. Dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
- d. Momentos antes de iniciar el ensamblaje de los 2 vidrios, remover las partículas de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha primero en una dirección y luego perpendicularmente a la primera, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Repel Silane y el gel podría adherirse al vidrio.

### **3. Preparación del gel de secuenciamiento (poliacrilamida 6%; 7M urea)**

Para el ensamblaje del sistema se siguen los siguientes pasos:

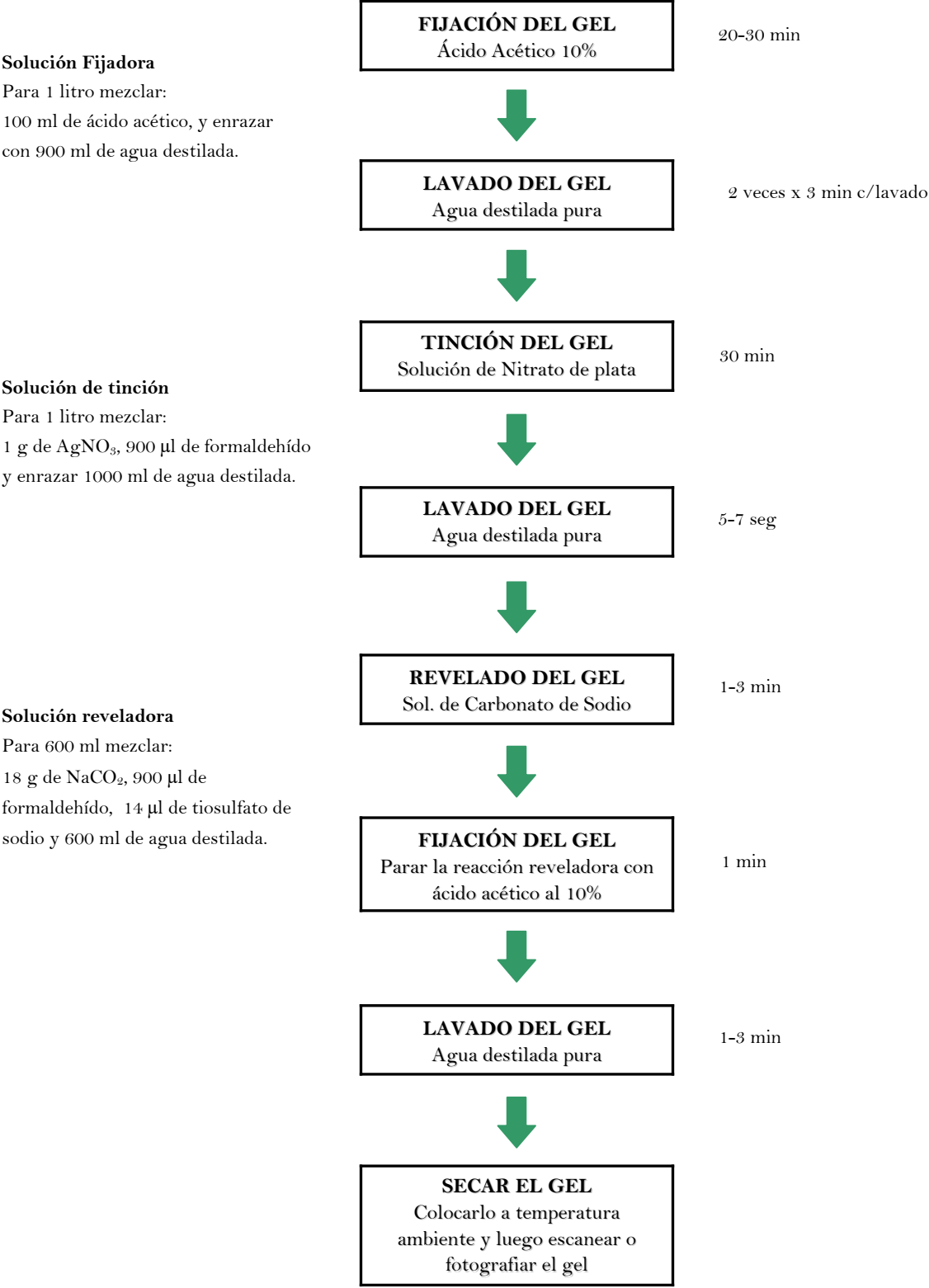
- a. Limpiar los espaciadores (0.4 mm de grosor) con alcohol al 96%. Colocar dos espaciadores laterales sobre la placa grande de vidrio (lado tratado). Sobre ella colocar la placa pequeña de vidrio de manera que los lados tratados estén mirándose y formen un “sándwich”.
- b. Entre las dos placas de vidrio se coloca el espaciador inferior.
- c. Asegurar las esquinas y los puntos medios del sistema con abrazaderas metálicas que ejerzan igual presión.
- d. Colocar los peines adecuados (de grosor preciso) en la parte superior del sistema.
- e. Tomar un volumen de 60 ml de solución de poliacrilamida 6% (20:1 acrilamida: bisacrilamida), adicionar 36 µl de TEMED y 360 µl de Persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente. Retirar los peines y verter la solución del gel a la placa de gel ensamblada, por una esquina, de manera continua para evitar la formación de burbujas.
- f. Colocar nuevamente los peines en las placas de vidrio.
- g. Dejar polimerizar el gel horizontalmente por lo menos 3 horas.

### **4. Electroforesis del gel**

- a. Pre-correr el gel de secuenciamiento a 60 W (42 mA; 1600 V) durante 30 min, con el objeto de eliminar el exceso de urea en el gel, en tampón de corrida TBE X y 0.5X en el tanque del ánodo y cátodo, respectivamente.
- b. Adicionar la mitad del volumen de tampón de carga Dye a la reacción de amplificación. No olvidar que cuando se use diferentes volúmenes de reacción de PCR, mantener el 50% de proporción del tampón de carga.
- c. Denaturar las muestras por 5 min a 95°C en el termociclador e inmediatamente colocar las muestras en hielo para evitar posibles renaturaciones.
- d. Cargar las muestras (6-7 µl) al gel de poliacrilamida 6% tan rápidamente como sea posible.
- e. Correr el gel a 450 V para corridas nocturnas “overnight”, o correr una electroforesis rápida en el día a 1000 V durante 1 hora seguido de 1600 V (60 W) por 3-5 horas según el tamaño esperado de los fragmentos.



APÉNDICE 7 Flujograma de la tinción con Nitrato de Plata



## APÉNDICE 8 Protocolo de geles SSCP

1. Optimizar las condiciones de PCR para obtener fuertes y claros productos como son visualizados en geles de agarosa teñidos en bromuro de etidio.
2. Al final del ciclo de PCR, adicionar igual volumen (5 µl) de tampón de carga (Dye) SSCP al volumen de reacción (dependiendo de la cantidad del producto de PCR). Antes de cargar, denaturar las muestras a 95°C por 5 min y luego colocar en hielo.

### Solución denaturante (Dye) SSCP

Para un volumen de 10 ml mezclar:

9.7 ml de Formamida, 100 µl de NaOH 1M, 100 µl de stock Dye (0.05% azul de bromofenol y 0.05% de xilene cianol) y enraizar con agua destilada a un volumen final de 10 ml.

3. Preparación de la solución stock de acrilamida al 40% (37.5:1 acrilamida: bis-acrilamida):

### Solución stock de Acrilamida

Para 100 ml de solución:

Pesar 37.5 g de acrilamida (AA), 1 g de bis-acrilamida y completar con agua Milli-Q a un volumen final de 100 ml. Filtrar la solución y guardar en un frasco oscuro o envuelto con papel aluminio a 4°C.

4. Preparación del gel SSCP
  - a. Preparar la solución de acrilamida al 8%.

### Solución de acrilamida al 8%

Para un volumen de 60 ml mezclar:

12.8 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida 40%, 1.8 ml de tampón TBE 10X, 9.6 ml de glicerol al 50% y enraizar con agua Milli-Q a un volumen final de 60 ml.

- b. Degasificar la solución de acrilamida con una bomba de vacío hasta quitar las burbujas (3-5 min).
- c. Adicionar 36 µl de TEMED y 360 µl de APS a la solución de acrilamida inmediatamente antes de verter la solución al gel, mezclando con suaves movimientos. Las dos soluciones son adicionadas para catalizar la reacción de polimerización.
- d. Dejar polimerizar el gel cerca de 2 a 3 h.
- e. Remover el peine y lavar los pozos de las muestras con tampón TBE 0.6X para remover la poliacrilamida no polimerizada.

5. Electroforesis del gel SSCP

La metodología de la electroforesis es la misma utilizada para geles denaturantes de poliacrilamida al 6% (ver Apéndice 8) pero con algunas diferencias. En el gel no denaturante se carga 6-7 µl de cada producto de PCR y se deja correr en tampón de corrida TBE 0.6X que ha sido pre-enfriado a 4°C para ambos tanques (ánodo y cátodo). Aplicar 400 V por 16-18 h (dejar toda la noche), ó 1600 V por 3 horas.

6. Tinción del gel SSCP

Al término de la corrida electroforética, sigue la metodología de tinción argéntica para visualizar las bandas (**Apéndice 7**).

## APÉNDICE 9 Preparación de Soluciones

### Tampón de extracción CTAB 2X

Reactivo	Cantidad
NaCl 5 M	280 ml
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	100 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	50 ml
CTAB	20 g
Agua destilada	550 ml

Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

### Tampón T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	10 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	2 ml
Agua destilada	988 ml

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

### Solución de Lavado 1

Reactivo	Cantidad
Etanol absoluto 100%	76 ml
Acetato de sodio 2.5 M	8 ml
Agua destilada	16 ml

### Solución de Lavado 2

Reactivo	Cantidad
Etanol absoluto 100%	76 ml
Acetato de amonio 1 M	1 ml
Agua destilada	23 ml

Gel de agarosa al 1% (p/v)

Reactivo	Cantidad
Agarosa	1 g
TBE 1X	100 ml
Bromuro de Etidio 0.1 µg/ml	1 µl

Disolver la agarosa en horno microondas por 2 min y verter en el molde.

Tampón de carga SALB 10X

Reactivo	Cantidad
Azul de Bromofenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 g
TBE 10X	2.5 ml
Agua destilada Mili-Q	47.5 ml

Iniciar con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada Mili-Q. Autoclavar.

Tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	10 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	0.2 ml
Agua destilada	989.8 ml

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Tampón PCR 10X para AFLP

Reactivo	Cantidad
Cloruro de potasio (KCl) 1 M	50 ml
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	10 ml
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) 1 M	1.5 ml
Agua destilada	38.5 ml

Esterilizar en autoclave y almacenar a −20°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

Tampón TBE 10X

Reactivo	Cantidad
Tris-Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	40 ml
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

Stock de poliacrilamida al 6%, 7 M de úrea

Reactivo	Cantidad
Agua Milli-Q	600 ml
TBE 10X	50 ml
Bis-acrilamida	3 g
Acrilamida	60 g
Úrea	420 g

Filtrar la poliacrilamida en papel y mantenerla a 4°C en una botella oscura.

Stock de Dye 5%

Reactivo	Cantidad
Azul de Bromofenol	0.5 g
Xilen cianol	0.5 g
Agua destilada Mili-Q	10 ml

Almacenar en tubo falcon de 50 ml.

Tampón de carga Dye

Reactivo	Cantidad
Formamida	9.6 ml
EDTA 0.2 M, pH 8.0	500 µl
Dye stock	100 µl